

=DE 102 38 978=WO 20040 18693=WO 20040 17749.

<p>2004-215840/21 D16 E15 (D13) SUNGENE GMBH & CO KGAA 2002.08.20 2002-1038978(+2002DE-1038978) (2004.03.04) A01H 5/08, A23K 1/00, A23L 1/00, 1/303, C07H 21/00, C12N 9/02, 15/52, C12P 23/00</p> <p>Method for preparing ketocarotenoids, useful e.g. as food or feed supplements, by increasing, or introducing, ketolase activity in the fruits of transgenic plants, also new nucleic acid constructs C2004-085423</p>	<p>D(3-G4, 3-H1E, 5-H8, 5-H12D5, 5-H12E, 5-H16B, 5-H17B3) E(3)</p> <p><u>USE</u> The modified plants with increased (II) activity are used: (i) as ornamentals; (ii) as food or animal feed; and (iii) for preparation of (I)-containing extracts or for preparing food/feed supplements (claimed), e.g., especially where (I) is astaxanthin, as a pigment for coloring trout, salmon and shrimps.</p>
<p><u>NOVELTY</u> Method for preparing ketocarotenoids (I) by culturing genetically modified plants that, in comparison with the wild-type, have altered ketolase (II) activity in the fruits.</p> <p><u>DETAILED DESCRIPTION</u> INDEPENDENT CLAIMS are also included for the following: (1) nucleic acid construct comprising a fruit-specific promoter linked functionally to a sequence that encodes (II); (2) genetically modified plants in which the fruits have (II) activity; and (3) method for preparing the plants of (2).</p>	<p><u>ADVANTAGE</u> The transgenic plants produce fruits with increased content of (I).</p> <p><u>EXAMPLE</u> Vector pS3KETO2 comprises, in pSUN5, a cassette containing the constitutive double 35S cauliflower mosaic virus promoter; the rbcS chloroplast transit peptide; the ketolase gene from <i>Haemococcus pluvialis</i> and a terminator. It was used to transform tomato cells, using <i>Agrobacterium tumefaciens</i>, and the infected cells regenerated to plants conventionally. One of the resulting transgenic lines, CS13-24, produced fruits that contained lycopene, β-carotene, canthaxanthin, DE 10238978-A+</p>

This Page Blank (uspto)

adonirubin or astaxanthin, but the last three were absent from wild-type fruits (which additionally contained lutein, not detected in transgenic fruits).

TECHNOLOGY FOCUS

Biotechnology - Preferred Plants: These contain at least one nucleic acid sequence that encodes (II), especially under control of a fruit-specific promoter, and particularly they contain chromoplasts in the fruit. Especially (II) is a 329 amino acid (aa) protein (2) from *Haematococcus pluvialis* or a 258 aa protein (16) from *Nostoc* sp., or sequences derived from them by substitution, insertion or deletion, but retaining at least 20% homology at the aa level and enzymatic activity. Especially it is encoded by 1771 or 777 bp sequences. Optionally the plants also have (increased) hydroxylase activity. About 80 suitable genera are listed, e.g. *Ananas*; *Citrus*, *Lycopersicon*; *Ribes* and *Vitis*.
Preferred Process: The (II)-encoding nucleic acid is inserted by standard methods, then the transgenic plants are cultivated, harvested and (I) isolated from their fruits.

Preferred Carotenoids: These are astaxanthin; canthaxanthin; echinenone (or its 3- or 3'-hydroxy derivatives); adonirubin or adonixanthin.

(77pp1251DwgNo.0/9)

DE 10238978-A

This Page Blank (uspic,



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 102 38 978 A1 2004.03.04

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: 102 38 978.0
(22) Anmeldetag: 20.08.2002
(43) Offenlegungstag: 04.03.2004

(51) Int Cl.: A01H 5/08
C12N 15/52, C12N 9/02, C12P 23/00,
A23K 1/00, A23L 1/00, A23L 1/303,
C07H 21/00

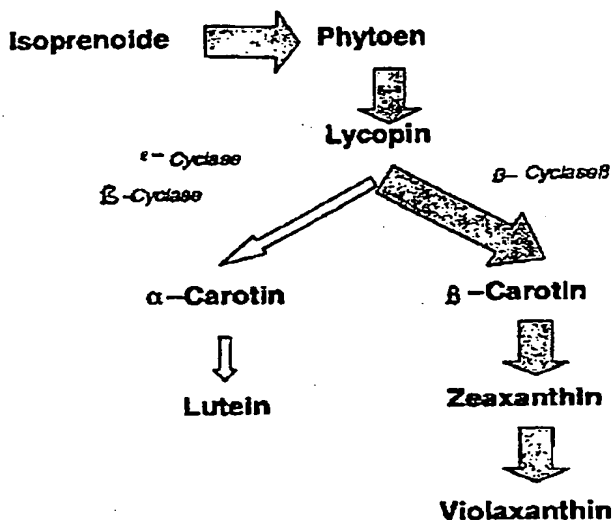
(71) Anmelder:
SunGene GmbH & Co. KGaA, 06466 Gatersleben,
DE

(72) Erfinder:
Erfinder wird später genannt werden

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden in Früchten von Pflanzen

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von genetisch veränderten Pflanzen, die in Früchten eine Ketolase-Aktivität aufweisen.



BEST AVAILABLE COPY

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von genetisch veränderten Pflanzen, die in Früchten eine Ketolase-Aktivität aufweisen, die genetisch veränderten Pflanzen, sowie deren Verwendung als Nahrungs- oder Futtermittel und zur Herstellung von Ketocarotinoidextrakten.

[0002] Carotinoide werden de novo in Bakterien, Algen, Pilzen und Pflanzen synthetisiert. Ketocarotinoide, also Carotinoide, die mindestens eine Keto-Gruppe enthalten, wie beispielsweise Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinenon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adoninrubin oder Adonixanthin sind natürliche Antioxidantien und Pigmente, die von einigen Algen und Mikroorganismen als Sekundärmetabolite produziert werden.

[0003] Aufgrund ihrer farbgebenden Eigenschaften werden die Ketocarotinoide und insbesondere Astaxanthin als Pigmentierhilfsstoffe in der Tierernährung, insbesondere in der Forellen-, Lachs- und Shrimpszucht verwendet.

[0004] Die Herstellung von Astaxanthin erfolgt heutzutage größtenteils durch chemische Syntheseverfahren. Natürliche Ketocarotinoide, wie beispielsweise natürliches Astaxanthin, werden heutzutage in biotechnologischen Verfahren in kleinen Mengen durch Kultivierung von Algen, beispielsweise *Haematococcus pluvialis*, oder durch Fermentation von gentechnologisch optimierten Mikroorganismen und anschließender Isolierung gewonnen.

[0005] Ein wirtschaftliches biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von natürlichen Ketocarotinoiden ist daher von großer Bedeutung.

[0006] WO 98/18910 beschreibt die Synthese von Ketocarotinoiden in Nektarien von Tabakblüten durch Einbringen eines Ketolase-Gens in Tabak.

[0007] WO 01/20011 beschreibt ein DNA Konstrukt zur Produktion von Ketocarotinoiden, insbesondere Astaxanthin, in Samen von Ölsaatzpflanzen wie Raps, Sonnenblume, Sojabohne und Senf unter Verwendung eines Samen-spezifischen Promotors und einer Ketolase aus *Haematococcus*.

[0008] Die im Stand der Technik offenbarten Verfahren liefern zwar genetisch veränderte Pflanzen, die in spezifischen Geweben einen Gehalt an Ketocarotinoiden aufweisen, weisen jedoch den Nachteil auf, dass die Höhe des Gehalts an Ketocarotinoiden und die Reinheit, insbesondere an Astaxanthin, noch nicht zufriedenstellend ist.

[0009] Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, ein alternatives Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von Pflanzen zur Verfügung zu stellen, bzw. weitere transgene Pflanzen, die Ketocarotinoide herstellen, zur Verfügung zu stellen, die optimierte Eigenschaften, wie beispielsweise einen höheren Gehalt an Ketocarotinoiden, aufweisen und den geschilderten Nachteil des Standes der Technik nicht aufweisen.

[0010] Demgemäß wurde ein Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden gefunden, indem man genetisch veränderte Pflanzen kultiviert, die in Früchten eine Ketolase-Aktivität aufweisen.

[0011] Unter Ketolase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Ketolase verstanden.

[0012] Unter einer Ketolase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, am, gegebenenfalls substituierten, β -Ionon-Ring von Carotinoiden eine Keto-Gruppe einzuführen.

[0013] Insbesondere wird unter einer Ketolase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, β -Carotin in Canthaxanthin umzuwandeln.

[0014] Dementsprechend wird unter Ketolase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Ketolase umgesetzte Menge β -Carotin bzw. gebildete Menge Canthaxanthin verstanden.

[0015] Um in den Früchten der genetisch veränderten Pflanzen eine Ketolaseaktivität aufzuweisen, werden in einer bevorzugten Ausführungsform genetisch veränderte Pflanzen verwendet, die in Früchten eine Ketolase exprimieren.

[0016] Vorzugsweise werden daher im erfindungsgemäßen Verfahren genetisch veränderte Pflanzen verwendet, die in Früchten mindestens eine Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthalten.

[0017] Es sind keine Pflanzen bekannt, die als Wildtyp in Früchten eine Ketolase-Aktivität aufweisen. Insbesondere weisen die nachstehend beschriebenen, bevorzugten Pflanzen in Früchten als Wildtyp keine Ketolase-Aktivität auf.

[0018] In der vorliegenden Erfindung wird die Ketolase-Aktivität in Früchten der genetisch veränderten Pflanzen durch die genetische Veränderung der Ausgangspflanze verursacht. Die erfindungsgemäße genetisch veränderte Pflanze weist somit, im Vergleich zur genetisch nicht veränderten Ausgangspflanze eine Ketolase-Aktivität in Früchten auf und ist somit vorzugsweise in der Lage, in Früchten eine Ketolase zu exprimieren.

[0019] Unter dem Begriff "Ausgangspflanze" oder "Wildtyp" wird die entsprechende nicht genetisch veränderte Ausgangspflanze verstanden.

[0020] Unter dem Begriff "genetisch veränderte Pflanze" wird vorzugsweise eine im Vergleich zur Ausgangspflanze genetisch veränderte Pflanze verstanden.

- [0021] Je nach Zusammenhang kann unter dem Begriff "Pflanze" die Ausgangspflanze (Wildtyp) oder eine erfindungsgemäße, genetisch veränderte Pflanze oder beides verstanden werden.
- [0022] Die Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, in den Früchten der Pflanzen erfolgt vorzugsweise durch Einbringen von Nukleinsäuren, die Ketolasen kodieren, in die Ausgangspflanze.
- [0023] Die Erfindung betrifft daher insbesondere das vorstehend beschriebene Verfahren, dadurch gekennzeichnet, dass man genetisch veränderte Pflanzen verwendet, in die man ausgehend von einer Ausgangspflanze, mindestens eine Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, eingebracht hat.
- [0024] Dazu kann prinzipiell jedes Ketolase-Gen, also jede Nukleinsäure die eine Ketolase kodiert, verwendet werden.
- [0025] Alle in der Beschreibung erwähnten Nukleinsäuren können beispielsweise eine RNA-, DNA- oder cDNA-Sequenz sein.
- [0026] Bei genomischen Ketolase-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall, dass die Wirtspflanze nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechenden Ketolase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs, zu verwenden.
- [0027] Beispiele für Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, und die entsprechenden Ketolasen, die im erfindungsgemäßen Verfahren bzw. in den nachstehend beschriebenen erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen verwendet werden können, sind beispielsweise Sequenzen aus *Haematococcus pluvialis*, insbesondere aus *Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille (Accession No. X86782; Nukleinsäure: SEQ ID No. 1, Protein SEQ ID No. 2), *Haematococcus pluvialis*, NIES-144 (Accession No. D45881; Nukleinsäure: SEQ ID No. 3, Protein SEQ ID No. 4), *Agrobacterium aurantiacum* (Accession No. D58420; Nukleinsäure: SEQ. ID. No. 5, Protein SEQ ID No. 6), *Alicigenes spec.* (Accession No. D58422; Nukleinsäure: SEQ ID No. 7, Protein SEQ ID No. 8), *Paracoccus marcusii* (Accession No. Y15112; Nukleinsäure: SEQ ID No. 9, Protein SEQ ID No. 10), *Synechocystis* sp. Strain PC6803 (Accession No. S76617, NP442491; Nukleinsäure: SEQ ID No. 11, Protein SEQ ID No. 12), *Bradyrhizobium* sp. (Accession No. AF218415, BAB 74888; Nukleinsäure: SEQ ID No. 13, Protein SEQ ID No. 14), *Nostoc* sp. Strain PCC7120 (Accession No. AP003592; Nukleinsäure: SEQ ID No. 15, Protein SEQ ID No. 16).
- [0028] Weitere natürliche Beispiele für Ketolasen und Ketolase-Gene, die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können, lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Identitätsvergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit den vorstehend beschriebenen Sequenzen und insbesondere mit den Sequenzen SEQ ID NO. 2 und/oder SEQ ID NO. 16 leicht auffinden.
- [0029] Weitere natürliche Beispiele für Ketolasen und Ketolase-Gene lassen sich weiterhin ausgehend von den vorstehend beschriebenen Nukleinsäuresequenzen, insbesondere ausgehend von den Sequenzen SEQ ID. No 1 und/oder SEQ ID NO. 15 aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungstechniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.
- [0030] Die Hybridisierung kann unter moderaten (geringe Stringenz) oder vorzugsweise unter stringenten (hohe Stringenz) Bedingungen erfolgen.
- [0031] Solche Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise bei Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., in: *Molecular Cloning (A Laboratory Manual)*, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31–9.57 oder in *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1–6.3.6 beschrieben.
- [0032] Beispielfhaft können die Bedingungen während des Waschschrilles ausgewählt sein aus dem Bereich von Bedingungen begrenzt von solchen mit geringer Stringenz (mit 2X SSC bei 50°C) und solchen mit hoher Stringenz (mit 0.2X SSC bei 50°C, bevorzugt bei 65°C) (20X SSC: 0,3 M Natriumcitrat, 3 M Natriumchlorid, pH 7.0).
- [0033] Darüberhinaus kann die Temperatur während des Waschschrilles von moderaten Bedingungen bei Raumtemperatur, 22°C, bis zu stringenten Bedingungen bei 65°C angehoben werden.
- [0034] Beide Parameter, Salzkonzentration und Temperatur, können gleichzeitig variiert werden, auch kann einer der beiden Parameter konstant gehalten und nur der andere variiert werden. Während der Hybridisierung können auch denaturierende Agenzien wie zum Beispiel Formamid oder SDS eingesetzt werden. In Gegenwart von 50 % Formamid wird die Hybridisierung bevorzugt bei 42°C ausgeführt.
- [0035] Einige beispielhafte Bedingungen für Hybridisierung und Waschschrill sind infolge gegeben:
- (1) Hybridisierungsbedingungen mit zum Beispiel
 - (i) 4X SSC bei 65°C, oder
 - (ii) 6X SSC bei 45°C, oder

- (iii) 6X SSC bei 68°C, 100 mg/ml denaturierter Fischsperma-DNA, oder
 - (iv) 6X SSC, 0,5 % SDS, 100 mg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA bei 68°C, oder
 - (v) 6XSSC, 0,5 % SDS, 100 mg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA, 50 % Formamid bei 42°C, oder
 - (vi) 50 % Formamid, 4X SSC bei 42°C, oder
 - (vii) 50 % (vol/vol) Formamid, 0,1 % Rinderserumalbumin, 0,1 % Ficoll, 0,1 % Polyvinylpyrrolidon, 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,5, 750 mM NaCl, 75 mM Natriumcitrat bei 42°C, oder
 - (viii) 2X oder 4X SSC bei 50°C (moderate Bedingungen), oder
 - (ix) 30 bis 40 % Formamid, 2X oder 4X SSC bei 42° (moderate Bedingungen).
- (2) Waschschrirte für jeweils 10 Minuten mit zum Beispiel
- (i) 0,015 M NaCl/0,0015 M Natriumcitrat/0,1 % SDS bei 50°C, oder
 - (ii) 0,1X SSC bei 65°C, oder
 - (iii) 0,1X SSC, 0,5 % SDS bei 68°C, oder
 - (iv) 0,1X SSC, 0,5 % SDS, 50 % Formamid bei 42°C, oder
 - (v) 0,2X SSC, 0,1 % SDS bei 42°C, oder
 - (vi) 2X SSC bei 65°C (moderate Bedingungen).

[0036] In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahrens bringt man Nukleinsäuren ein, die ein Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 %, vorzugsweise mindestens 30 %, bevorzugter mindestens 40 %, bevorzugter mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 60 %, bevorzugter mindestens 70 %, bevorzugter mindestens 80 %, besonders bevorzugt mindestens 90 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO. 2 und die enzymatische Eigenschaft einer Ketolase aufweist.

[0037] Dabei kann es sich um eine natürliche Ketolase-Sequenz handeln, die wie vorstehend beschrieben durch Identitätsvergleich der Sequenzen aus anderen Organismen gefunden werden kann oder um eine künstliche Ketolase-Sequenz die ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO. 2 durch künstliche Variation, beispielsweise durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgewandelt wurde.

[0038] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren bringt man man Nukleinsäuren ein, die ein Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 16 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 %, vorzugsweise mindestens 30 %, bevorzugter mindestens 40 %, bevorzugter mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 60 %, bevorzugter mindestens 70 %, bevorzugter mindestens 80 %, besonders bevorzugt mindestens 90 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO. 16 und die enzymatische Eigenschaft einer Ketolase aufweist.

[0039] Dabei kann es sich um eine natürliche Ketolase-Sequenz handeln, die wie vorstehend beschrieben durch Identitätsvergleich der Sequenzen aus anderen Organismen gefunden werden kann oder um eine künstliche Ketolase-Sequenz die ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO. 16 durch künstliche Variation, beispielsweise durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgewandelt wurde.

[0040] Unter dem Begriff "Substitution" ist in der Beschreibung der Austausch einer oder mehrerer Aminosäuren durch eine oder mehrere Aminosäuren zu verstehen. Bevorzugt werden sog. konservative Austausche durchgeführt, bei denen die ersetzte Aminosäure eine ähnliche Eigenschaft hat wie die ursprüngliche Aminosäure, beispielsweise Austausch von Glu durch Asp, Gln durch Asn, Val durch Ile, Leu durch Ile, Ser durch Thr.

[0041] Deletion ist das Ersetzen einer Aminosäure durch eine direkte Bindung. Bevorzugte Positionen für Deletionen sind die Termini des Polypeptides und die Verknüpfungen zwischen den einzelnen Proteindomänen.

[0042] Insertionen sind Einfügungen von Aminosäuren in die Polypeptidkette, wobei formal eine direkte Bindung durch ein oder mehrere Aminosäuren ersetzt wird.

[0043] Unter Identität zwischen zwei Proteinen wird die Identität der Aminosäuren über die jeweils gesamte Proteinlänge verstanden, insbesondere die Identität die durch Vergleich mit Hilfe der Lasergene Software der Firma DNASTAR, inc. Madison, Wisconsin (USA) unter Anwendung der Clustal Methode (Higgins DG, Sharp PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. Comput Appl. Biosci. 1989 Apr;5(2):151-1) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

Multiple alignment parameter:

Gap penalty	10
Gap length penalty	10
Pairwise alignment parameter:	
K-tuple	1
Gap penalty	3
Window	5
Diagonals saved	5

[0044] Unter einem Protein, das eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO. 2 oder 16 aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ ID NO. 2 oder 16, insbesondere nach obigen Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 20 % aufweist.

[0045] Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

[0046] Bevorzugt werden dafür solche Kodons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen Codon usage häufig verwendet werden. Die Codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

[0047] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO. 1, in den Pflanze ein.

[0048] In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO. 15, in den Pflanze ein.

[0049] Alle vorstehend erwähnten Ketolase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoramiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

[0050] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet man genetisch veränderte Pflanzen, die in Früchten die höchste Expressionsrate einer Ketolase aufweisen.

[0051] Vorzugsweise wird dies dadurch erreicht, dass die Genexpression der Ketolase unter Kontrolle eines fruchtspezifischen Promotors erfolgt. Beispielsweise werden dazu die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, wie nachstehend ausführlich beschrieben, in einem Nukleinsäurekonstrukt, funktionell verknüpft mit einem fruchtspezifischen Promotor, in die Pflanze eingebracht.

[0052] Unter Pflanzen werden erfindungsgemäß vorzugsweise Pflanzen verstanden, die als Wildtyp in Früchten Chromoplasten aufweisen.

[0053] Weiter bevorzugte Pflanzen weisen als Wildtyp in den Früchten zusätzlich Carotinoide, insbesondere β -Carotin, Zeaxanthin, Neoxanthin, Violaxanthin oder Lutein auf.

[0054] Weiter bevorzugte Pflanzen weisen als Wildtyp in den Früchten zusätzlich eine Hydroxylase-Aktivität auf.

[0055] Unter Hydroxylase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Hydroxylase verstanden.

[0056] Unter einer Hydroxylase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, am gegebenenfalls substituierten, β -Ionon-Ring von Carotinoiden eine Hydroxy-Gruppe einzuführen.

[0057] Insbesondere wird unter einer Hydroxylase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, β -Carotin in Zeaxanthin oder Canthaxanthin in Astaxanthin umzuwandeln.

[0058] Dementsprechend wird unter Hydroxylase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Hydroxylase umgesetzte Menge β -Carotin oder Canthaxanthin bzw. gebildete Menge Zeaxanthin oder Astaxanthin verstanden.

[0059] Besonders bevorzugte Pflanzen sind Pflanzen, ausgewählt aus den Pflanzengattungen Actinophloeus, Aglaeonema, Ananas, Arbutus, Archontophoenix, Area, Aronia, Asparagus, Attalea, Berberis, Bixia, Brachychilum, Bryonia, Caliptocalix, Capsicum, Carica, Celastrus, Citrullus, Citrus, Convallaria, Cotoneaster, Crataegus, Cucumis, Cucurbita, Cuscuta, Cycas, Cyphomandra, Dioscorea, Diospyrus, Dura, Elaeagnus, Elaeagnus, Erythroxylon, Euonymus, Ficus, Fortunella, Fragaria, Gardinia, Gonocaryum, Gossypium, Guava, Guilielma, Hibiscus, Hippophaea, Iris, Lathyrus, Lonicera, Luffa, Lycium, Lycopersicum, Malpighia, Mangifera, Morimodica, Murraya, Musa, Nenga, Palisota, Pandanus, Passiflora, Persea, Physalis, Prunus, Ptychandra, Punica, Pyracantha, Pyrus, Ribes, Rosa, Rubus, Sabal, Sambucus, Seaforita, Shepherdia, Solanum, Sorbus, Symplocos, Tabernaemontana, Tamus, Taxus, Trichosanthes, Triphasia, Vaccinium, Viburnum, Vigna oder Vitis.

- [0060] Die Bestimmung der Ketolase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen erfolgt in Anlehnung an die Methode von Frazer et al., (J. Biol. Chem. 272(10): 6121-6135, 1997). Die Ketolase-Aktivität in pflanzlichen Extrakten wird mit den Substraten beta-Carotin und Canthaxanthin in Gegenwart von Lipid (Sofalecithin) und Detergens (Natriumcholat) bestimmt. Substrat/ Produkt-Verhältnisse aus den Ketolase-Assays werden mittels HPLC ermittelt.
- [0061] Im erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden wird vorzugsweise dem Kultivierungsschritt der genetisch veränderten Pflanzen, im folgenden auch transgene Pflanzen bezeichnet, ein Ernten der Pflanzen und ein Isolieren von Ketocarotinoiden aus den Früchten der Pflanzen angeschlossen.
- [0062] Die transgenen Pflanzen werden in an sich bekannter Weise auf Nährböden gezogen und entsprechend geerntet.
- [0063] Die Isolierung von Ketocarotinoiden aus den geernteten Früchten erfolgt in an sich bekannter Weise, beispielsweise durch Trocknung und anschließender Extraktion und gegebenenfalls weiterer chemischer oder physikalischer Reinigungsprozesse, wie beispielsweise Fällungsmethoden, Kristallographie, thermische Trennverfahren, wie Rektifizierverfahren oder physikalische Trennverfahren, wie beispielsweise Chromatographie. Die Isolierung von Ketocarotinoiden aus den Früchten erfolgt beispielsweise bevorzugt durch organische Lösungsmittel wie Aceton, Hexan, Ether oder tert.-Methylbutylether.
- [0064] Weitere Isolierverfahren von Ketocarotinoiden sind beispielsweise in Egger und Kleinig (Phytochemistry (1967) 6, 437-440) und Egger (Phytochemistry (1965) 4, 609-618) beschrieben.
- [0065] Vorzugsweise sind die Ketocarotinoide ausgewählt aus der Gruppe Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinonon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin und Adonixanthin.
- [0066] Ein besonders bevorzugtes Ketocarotinoid ist Astaxanthin.
- [0067] Die Herstellung der transgenen Pflanzen erfolgt vorzugsweise durch Transformation der Ausgangspflanzen, mit einem Nukleinsäurekonstrukt, das die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, enthält, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten.
- [0068] Diese Nukleinsäurekonstrukte, in denen die kodierende Nukleinsäuresequenz mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten, werden im folgenden auch Expressionskassetten genannt.
- [0069] Vorzugsweise enthalten die Regulationssignale einen oder mehrere Promotoren, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten.
- [0070] Die Expressionskassetten beinhalten Regulationssignale, also regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfasst eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für mindestens eines der vorstehend beschriebenen Gene operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.
- [0071] Im folgenden werden beispielhaft die bevorzugten Nukleinsäurekonstrukte, Expressionskassetten und Vektoren für Pflanzen und Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen, sowie die transgenen Pflanzen selbst beschrieben.
- [0072] Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten aber nicht darauf beschränkten Sequenzen sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693-8711).
- [0073] Als Promotoren der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann.
- [0074] "Konstitutiver" Promotor meint solche Promotoren, die eine Expression in zahlreichen, bevorzugt allen, Geweben über einen größeren Zeitraum der Pflanzenentwicklung, bevorzugt zu allen Zeitpunkten der Pflanzenentwicklung, gewährleisten.
- [0075] Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der Promotor des 35S-Transkriptes des CaMV Blumenkohlmosaikvirus (Franck et al. (1980) Cell 21:285-294; Odell et al. (1985) Nature 313:810-812; Shewmaker et al. (1985) Virology 140:281-288; Gardner et al. (1986) Plant Mol Biol 6:221-228) oder der 19S CaMV Promotor (US 5,352,605; WO 84/02913; Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202).
- [0076] Ein weiterer geeigneter konstitutiver Promotor ist der pds Promotor (Pecker et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci USA 89: 4962-4966) oder der "Rubisco small subunit (SSU)"-Promotor (US 4,962,028), der LeguminB-Promotor (GenBank Acc.-Nr. X03677), der Promotor der Nopalinsynthase aus Agrobacterium, der

TR-Doppelpromotor, der OCS (Octopin Synthase) Promotor aus *Agrobacterium*, der Ubiquitin Promotor (Holtorf S et al. (1995) *Plant Mol Biol* 29:637-649), den Ubiquitin 1 Promotor (Christensen et al. (1992) *Plant Mol Biol* 18:675-689; Bruce et al. (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86:9692-9696), den Smas Promotor, den Cinnamylalkoholdehydrogenase-Promotor (US 5,683,439), die Promotoren der vakuolären ATPase Untereinheiten oder der Promotor eines prolinreichen Proteins aus Weizen (WO 91/13991), der Pnit-Promotor (Y07648.L, Hillebrand et al. (1998), *Plant. Mol. Biol.* 36, 89-99, Hillebrand et al. (1996), *Gene*, 170, 197-200) sowie weitere Promotoren von Genen, deren konstitutive Expression in Pflanzen dem Fachmann bekannt ist.

[0077] Die Expressionskassetten können auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten (Übersichtsartikel: Gatz et al. (1997) *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48:89-108), durch den die Expression des Ketolase-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren, wie z.B. der PRP1 Promotor (Ward et al. (1993) *Plant Mol Biol* 22:361-366), durch Salicylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzolsulfonamid-induzierbarer Promotor (EP 0 388 186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) *Plant J* 2:397-404), ein durch Abscisinsäure induzierbarer Promotor (EP 0 335 528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer Promotor (WO 93/21334) können ebenfalls verwendet werden.

[0078] Ferner sind Promotoren bevorzugt, die durch biotischen oder abiotischen Stress induziert werden wie beispielsweise der pathogeninduzierbare Promotor des PRP1-Gens (Ward et al. (1993) *Plant Mol Biol* 22:361-366), der hitzeinduzierbare hsp70- oder hsp80-Promotor aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare alpha-Amylase Promotor aus der Kartoffel (WO 96/12814), der licht-induzierbare PPDK Promotor oder der verwundungsinduzierte pinII-Promotor (EP375091).

[0079] Pathogen-induzierbare Promotoren umfassen die von Genen, die infolge eines Pathogenbefalls induziert werden wie beispielsweise Gene von PR-Proteinen, SAR-Proteinen, b-1,3-Glucanase, Chitinase usw. (beispielsweise Redolfi et al. (1983) *Neth J Plant Pathol* 89:245-254; Uknes, et al. (1992) *The Plant Cell* 14:645-656; Van Loon (1985) *Plant Mol Biol* 4:111-116; Marineau et al. (1987) *Plant Mol Biol* 9:335-342; Matton et al. (1987) *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2:325-342; Somssich et al. (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* 83:2427-2430; Somssich et al. (1988) *Mol Gen Genetics* 2:93-98; Chen et al. (1996) *Plant J* 10:955-966; Zhang and Sing (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* 91:2507-2511; Warner, et al. (1993) *Plant J* 3:191-201; Siebertz et al. (1989) *Plant Cell* 1:961-968 (1989).

[0080] Umfasst sind auch verwundungs-induzierbare Promotoren wie der des pinII Gens (Ryan (1990) *Ann Rev Phytopath* 28:425-449; Duan et al. (1996) *Nat Biotech* 14:494-498), des wun1 und wun2-Gens (US 5,428,148), des win1- und win2-Gens (Stanford et al. (1989) *Mol Gen Genet* 215:200-208), des Systemin (Mogul et al. (1992) *Science* 225:1570-1573), des WIP1-Gens (Rohmeier et al. (1993) *Plant Mol Biol* 22:783-792; Eckelkamp et al. (1993) *FEBS Letters* 323:73-76), des MPI-Gens (Corderok et al. (1994) *The Plant J* 6(2):141-150) und dergleichen.

[0081] Weitere geeignete Promotoren sind beispielsweise fruchtreifungsspezifische Promotoren, wie beispielsweise der fruchtreifung-spezifische Promotor aus Tomate (WO 94/21794, EP 409 625). Entwicklungsabhängige Promotoren schließen zum Teil die gewebespezifischen Promotoren ein, da die Ausbildung einzelner Gewebe naturgemäß entwicklungsabhängig erfolgt.

[0082] Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen beispielsweise die Biosynthese von Ketocarotinoiden bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Bevorzugt sind beispielsweise Promotoren mit Spezifitäten für die Antheren, Ovarien, Petalen, Sepalen, Blüten, Blätter, Stengel, Wurzeln und Früchte und Kombinationen hieraus.

[0083] Knollen-, Speicherwurzel- oder Wurzel-spezifische Promotoren sind beispielsweise der Patatin Promotor Klasse I (B33) oder der Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel.

[0084] Blattspezifische Promotoren sind beispielsweise der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel (WO 97/05900), der SSU Promotor (small subunit) der Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase) oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al. (1989) *EMBO J* 8:2445-2451).

[0085] Blütenspezifische Promotoren sind beispielsweise der Phytoen Synthase Promotor (WO 92/16635) oder der Promotor des P-rr Gens (WO 98/22593).

[0086] Antheren-spezifische Promotoren sind beispielsweise der 5126-Promotor (US 5,689,049, US 5,689,051), der glob-I Promotor oder der g-Zein Promotor.

[0087] Fruchtspezifische Promotoren sind beispielsweise der Pds-Promotor aus Tomate (Genbank-ACCESSION U46919; Corona, V., Aracri, B., Kosturkova, G., Bartley, G.E., Pitto, L., Giorgetti, L., Scolnik, P.A. and Giuliano, G., Regulation of a carotenoid biosynthesis gene promoter during plant development *Plant J.* 9 (4), 505-512 (1996)), SEQ ID NO.17, der 2A11 Promotor aus Tomate (Pear, J.R., Ridge, N., Rasmussen, R., Rose, R.E. and Houck, C.M. Isolation and characterization of a fruit-specific cDNA and the corresponding genomic clone from tomato *Plant Mol. Biol.* 13 (6), 639-651 (1989), SEQ ID NO. 18,

der Cucumisin Promotor (Yamagata, H., Yonesu, K., Hirata, A. and Aizono, Y., TGTCACA Motif Is a Novel cis-Regulatory Enhancer Element Involved in Fruit-specific Expression of the cucumisin Gene *J. Biol. Chem.*

277 (13), 11582–11590 (2001), SEQ ID NO. 19,

der Promoter des Endogalacturonasgens (Redondo-Navado, J., Medina-Escobar, N., Caballero-Repullo, J.L. and Munoz-Blanco, J.

A fruit-specific and developmentally regulated endo-polygalacturonase gene from strawberry (*Fragaria x ananassa* c.v. Chandler), *J Experimental Botany* 52 (362) 1941–1945 (2001), SEQ ID NO. 20,

der Polygalacturonase Promoter aus Tomate (Nicholass, F.J., Smith, C.J., Schuch, W., Bird, C.R. and Grierson, D., High levels of ripening-specific reporter gene expression directed by tomato fruit polygalacturonase gene-flanking regions, *Plant Mol. Biol.* 28 (3), 423–435 (1995)), SEQ ID NO. 21,

die TMF7 und TMF9 Promotoren (US 5608150),

der Promotor E4 (Cordes S. Deikman J. Margossian L.J. Fischer R.L. Interaction of a developmentally regulated DNA-binding factor with sites flanking two different fruit-ripening genes from tomato (1989), *Plant Cell* 1, 1025–1034) und

der Promotor E8 (Deikman and Fisher, Interaction of a DNA binding factor with the 5'-flanking region of an ethylene-responsive fruit ripening gene from tomato (1988), *EMBO J.* 7, 3315–3320). Weitere zur Expression in Pflanzen geeignete Promotoren sind beschrieben (Rogers et al. (1987) *Meth in Enzymol* 153:253–277; Schardl et al. (1987) *Gene* 61:1–11; Berger et al. (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86:8402–8406).

[0088] Alle in der vorliegenden Anmeldung beschriebenen Promotoren ermöglichen in der Regel die Expression der Ketolase in Früchten der erfindungsgemäßen Pflanzen.

[0089] Besonders bevorzugt im erfindungsgemäßen Verfahren sind konstitutive sowie insbesondere fruchtspezifische Promotoren.

[0090] Die vorliegende Erfindung betrifft daher insbesondere ein Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend funktionell verknüpft einen fruchtspezifischen Promotor, besonders bevorzugt einen oben beschriebenen fruchtspezifischen Promotor, und eine Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase.

[0091] Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt vorzugsweise durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer vorstehend beschriebenen Nukleinsäure kodierend eine Ketolase und vorzugsweise einer zwischen Promotor und Nukleinsäure-Sequenz inserierten Nukleinsäure, die für ein plastidenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

[0092] Die vorzugsweise insertierte Nukleinsäuren, kodierend ein plastidäres Transitpeptid, gewährleisten die Lokalisation in Plastiden und insbesondere in Chromoplasten.

[0093] Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren Nukleinsäure-Sequenz für ein Ketolase-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des Polypeptides steuert. Bevorzugt sind für die Chromoplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation der Ketolase in die Chromoplasten vom Ketolase-Teil enzymatisch abgespalten werden.

[0094] Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären *Nicotiana tabacum* Transketolase oder einem anderen Transitpeptid (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco (rbcS) oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase als auch der Isopentenylpyrophosphat Isomerase-2) oder dessen funktionellem Äquivalent abgeleitet ist.

[0095] Besonders bevorzugt sind Nukleinsäure-Sequenzen von drei Kassetten des Plastiden-Transitpeptids der plastidären Transketolase aus Tabak in drei Leserastern als KpnI/BamHI Fragmente mit einem ATG-Kodon in der NcoI Schnittstelle:

pTP09

KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTGTC
CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCTCACTTTTCCGGCCCTTAA
ATCCAATCCCAATATCACCACCTCCCGCCGCGTACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGTCG
TAAGGTCACCGCGGATTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAACCTGAGACTGCGGGA
TCC_BamHI

pTP10

KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTGTC
CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCTCACTTTTCCGGCCCTTAA
ATCCAATCCCAATATCACCACCTCCCGCCGCGTACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGTCG

TAAGGTCACCGGCCTTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTGAAGTGCCTG
GATCC_BamHI

pTP11

KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC
CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCTTCTTCTCTCACTTTTCCGGCCTTAA
ATCCAATCCCAATATCACCACCTCCCGCCGCGTACTCCTTCTTCCGCGCCGCGCCGCGCGTCTG
TAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTGAAGTGCCTG
ATCC_BamHI

[0096] Weitere Beispiele für ein plastidäres Transitpeptid sind das Transitpeptid der plastidären Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2) aus *Arabidopsis thaliana* und das Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Ribulosebiphosphat Carboxylase (rbcS) aus Erbse (Guerineau, F. Woolston, S. Brooks, L. Mullineaux, P. (1988) An expression cassette for targeting foreign proteins into the chloroplasts. *Nucl. Acids Res.* 16: 11380).

[0097] Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen Nukleinsäure-Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen.

[0098] Bevorzugt sind, wie vorstehend beschrieben, synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Kodons, die von Pflanzen bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons können aus Kodons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden.

[0099] Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

[0100] Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Die Expressionskassette beinhaltet vorzugsweise in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine kodierende Nukleinsäuresequenz oder ein Nukleinsäurekonstrukt und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

[0101] Ein Beispiel für einen Terminator ist der 35S-Terminator (Guerineau et al. (1988) *Nucl. Acids Res.* 16: 11380), der nos Terminator (Deplicker A, Stachel S, Dhaese P, Zambryski P, Goodman HM. Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *J Mol Appl Genet.* 1982;1(6):561-73) oder der ocs Terminator (Gielen, J, de Beuckeleer, M, Seurinck, J, Debroek, H, de Greve, H, Lemmers, M, van Montagu, M, Schell, J (1984) The complete sequence of the TL-DNA of the *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiAch5. *EMBO J.* 3: 835-846).

[0102] Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können in vitro-Mutagenese, "primer-repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden.

[0103] Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewingback" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

[0104] Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopine Synthase) des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., *EMBO J.* 3 (1984), 835 ff) oder funktionelle Äquivalente.

[0105] Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet.

[0106] Dazu können an sich bekannte Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt werden.

[0107] Geeignete Methoden zur Transformation von Pflanzen sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone – die sogenannte bombardment Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der, vorstehend beschriebene, durch *Agrobacterium* vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., *Techniques for Gene Transfer*, in: *Transgenic Plants*, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993),

- 128–143 sowie in Potryk *et al.* *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 42 (1991), 205–225) beschrieben.
- [0108] Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 12 (1984), 8711) oder besonders bevorzugt pSUN2, pSUN3, pSUN4 oder pSUN5 (WO 02/00900).
- [0109] Mit einem Expressionsplasmid transformierte Agrobakterien können in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.
- [0110] Zur bevorzugten Herstellung von genetisch veränderten Pflanzen, im folgenden auch transgene Pflanzen bezeichnet, wird die fusionierte Expressionskassette, die eine Ketolase exprimiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19 oder insbesondere pSUN2 kloniert, der geeignet ist, in *Agrobacterium tumefaciens* transformiert zu werden.
- [0111] Mit einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.
- [0112] Die Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien ist unter anderem bekannt aus F.F. White, *Vectors for Gene Transfer in Higher Plants*; in *Transgenic Plants*, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15–38. Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die ein in die Expressionskassette integriertes Gen für die Expression einer Nukleinsäure codierend eine Ketolase enthalten.
- [0113] Zur Transformation einer Wirtspflanze mit einer für eine Ketolase kodierenden Nukleinsäure wird eine Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale, beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71–119 (1993) beschrieben.
- [0114] Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in *E. coli*, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. pJIT117 (Guerineau *et al.* (1988) *Nucl. Acids Res.* 16 :11380), pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien, pACYC184, pMC1210, pMcl 210 und pCL1920. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren können.
- [0115] Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression konstitutiv oder vorzugsweise spezifisch in den Früchten erfolgen.
- [0116] Dementsprechend betrifft die Erfindung ferner ein Verfahren zur Herstellung von genetisch veränderten Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend funktionell verknüpft einen fruchtspezifischen Promotor und Nukleinsäuren kodierend eine Ketolase in das Genom der Ausgangspflanze einführt.
- [0117] Die Erfindung betrifft ferner die genetisch veränderten Pflanzen, die im Vergleich zur Ausgangspflanze in Früchten eine Ketolase-Aktivität aufweist.
- [0118] Die Ketolaseaktivität wird in einer bevorzugten Ausführungsform dadurch erreicht, dass die genetisch veränderte Pflanze in den Früchten eine Ketolase exprimiert.
- [0119] Die bevorzugten, genetisch veränderten Pflanzen enthalten daher in Früchten mindestens eine Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase.
- [0120] In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt, wie vorstehend ausgeführt, die Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, durch Einbringen von Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, in die Ausgangspflanze.
- [0121] Der Erfindung betrifft daher besonders bevorzugt eine vorstehend beschriebene genetisch veränderte Pflanze, dadurch gekennzeichnet, dass man in die Pflanze ausgehend von einer Ausgangspflanze mindestens eine Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase eingebracht hat.
- [0122] Die Erfindung betrifft insbesondere genetisch veränderte Pflanzen, ausgewählt aus den Pflanzengattungen *Actinophloeus*, *Aglaeonema*, *Ananas*, *Arbutus*, *Archontophoenix*, *Area*, *Aronia*, *Asparagus*, *Attalea*, *Berberis*, *Bixia*, *Brachychilum*, *Bryonia*, *Caliptocalix*, *Capsicum*, *Carica*, *Celastrus*, *Citrullus*, *Citrus*, *Convallaria*, *Cotoneaster*, *Crataegus*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Cuscuta*, *Cycas*, *Cyphomandra*, *Dioscorea*, *Diospyrus*, *Durra*, *Cotoneaster*, *Crataegus*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Cuscuta*, *Cycas*, *Cyphomandra*, *Dioscorea*, *Diospyrus*, *Durra*, *Elaeagnus*, *Elaeis*, *Erythroxylon*, *Euonymus*, *Ficus*, *Fortunella*, *Fragaria*, *Gardinia*, *Gonocaryum*, *Gossypira*, *Elaeagnus*, *Elaeis*, *Erythroxylon*, *Euonymus*, *Ficus*, *Fortunella*, *Fragaria*, *Gardinia*, *Gonocaryum*, *Gossypira*, *Guava*, *Guilielma*, *Hibiscus*, *Hippophaea*, *Iris*, *Lathyrus*, *Lonicera*, *Luffa*, *Lycium*, *Lycopersicum*, *Malpighia*, *Mangifera*, *Mormodica*, *Murraya*, *Musa*, *Nenga*, *Palisota*, *Pandanus*, *Passiflora*, *Persea*, *Physalis*, *Prunus*, *Ptychandra*, *Punica*, *Pyracantha*, *Pyrus*, *Ribes*, *Rosa*, *Rubus*, *Sabal*, *Sambucus*, *Seaforita*, *Shepherdia*, *Solanum*, *Sorbus*, *Synsapidix*, *Tabernae*, *Tamus*, *Taxus*, *Trichosanthes*, *Triphasia*, *Vaccinium*, *Viburnum*, *Vignia* oder *Vitis*, enthaltend mindestens eine Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase.
- [0123] Ganz besonders bevorzugte Pflanzengattungen sind *Ananas*, *Asparagus*, *Capsicum*, *Citrus*, *Cucumis*,

Cucurbita, Citrullus, Lycopersicum, Passiflora, Prunus, Physalis, Solanum, Vaccinium und Vitis, enthaltend mindestens eine transgene Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase.

[0124] Wie vorstehend erwähnt wird in bevorzugten transgenen Pflanzen die Ketolase in den Früchten exprimiert, besonderes bevorzugt ist die Expression der Ketolase in den Früchten am höchsten.

[0125] Die transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile, insbesondere deren Früchte sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

[0126] Die genetisch veränderten Pflanzen können, wie vorstehend beschrieben, zur Herstellung von Ketocarotinoiden, insbesondere Astaxanthin, verwendet werden.

[0127] Von Menschen und Tieren verzehrbare erfindungsgemäße, genetisch veränderte Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Ketocarotinoiden können auch beispielsweise direkt oder nach an sich bekannter Prozessierung als Nahrungsmittel oder Futtermittel oder als Futter- und Nahrungsergänzungsmittel verwendet werden. Ferner können die genetisch veränderten Pflanzen zur Herstellung von Ketocarotinoid-haltigen Extrakten der Pflanzen und/oder zur Herstellung von Futter- und Nahrungsergänzungsmitteln verwendet werden.

[0128] Die genetisch veränderten Pflanzen weisen im Vergleich zum Wildtyp einen erhöhten Gehalt an Ketocarotinoiden auf.

[0129] Unter einem erhöhten Gehalt an Ketocarotinoiden wird in der Regel ein erhöhter Gehalt an Gesamt-Ketocarotinoid verstanden.

[0130] Unter einem erhöhten Gehalt an Ketocarotinoiden wird aber auch insbesondere ein veränderter Gehalt der bevorzugten Ketocarotinoide verstanden, ohne dass zwangsläufig der Gesamt-Carotinoidgehalt erhöht sein muss.

[0131] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform weisen die erfindungsgemäßen, genetisch veränderten Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp einen erhöhten Gehalt an Astaxanthin auf.

[0132] Unter einem erhöhten Gehalt wird in diesem Fall insbesondere ein verursachter Gehalt an Ketocarotinoiden, bzw. Astaxanthin verstanden.

[0133] Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt: Allgemeine Experimentelle Bedingungen: Sequenzanalyse rekombinanter DNA

[0134] Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma Licor (Vertrieb durch MWG Biotec, Ebersbach) nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463-5467).

Beispiel 1: Amplifikation einer cDNA, die die gesamte Primärsequenz der Ketolase aus Haematococcus pluvialis Flotow em. Wille kodiert

[0135] Die cDNA, die für die Ketolase aus Haematococcus pluvialis kodiert, wurde mittels PCR aus Haematococcus pluvialis (Stamm 192.80 der "Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen") Suspensionskultur amplifiziert.

[0136] Für die Präparation von Total-RNA aus einer Suspensionskultur von Haematococcus pluvialis (Stamm 192.80), die 2 Wochen mit indirektem Tageslicht bei Raumtemperatur in Haematococcus Medium (1.2 g/l Natriumacetat, 2 g/l Hefeextrakt, 0.2 g/l $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.02 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; pH 6.8; nach Autoklavieren Zugabe von 400 mg/l L-Asparagin, 10 mg/l $FeSO_4 \cdot H_2O$) gewachsen war, wurden die Zellen geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Mörser pulverisiert. Anschließend wurden 100 mg der gefrorenen, pulverisierten Algenzellen in ein Reaktionsgefäß überführt und in 0,8 ml Trizol-Puffer (Life Technologies) aufgenommen. Die Suspension wurde mit 0,2 ml Chloroform extrahiert. Nach 15minütiger Zentrifugation bei 12000 g wurde der wässrige Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Ethanol extrahiert. Die RNA wurde mit einem Volumen Isopropanol gefällt, mit 75 % Ethanol gewaschen und das Pellet in DEPC Wasser (über Nacht Inkubation von Wasser mit 1/1000 Volumen Diethylpyrocarbonat bei Raumtemperatur, anschließend autoklaviert) gelöst. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

[0137] Für die cDNA-Synthese wurden 2.5 µg Gesamt-RNA für 10 min bei 60°C denaturiert, für 2 min auf Eis abgekühlt und mittels eines cDNA-Kits (Ready-to-go-you-prime-beads, Pharmacia Biotech) nach Herstellerangaben unter Verwendung eines antisense spezifischen Primers (PR1 SEQ ID No. 29) in cDNA umgeschrieben.

[0138] Die Nukleinsäure codierend eine Ketolase aus Haematococcus pluvialis (Stamm 192.80) wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus Haematococcus pluvialis unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR2 SEQ ID No. 30) und eines antisense spezifischen Primers (PR1 SEQ ID No. 29) amplifiziert.

[0139] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der cDNA, die für ein Ketolase Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 4 µl einer Haematococcus pluvialis cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 mM PR1 (SEQ ID No. 29)

- 0,2 mM PR2 (SEQ ID No. 30)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25,8 µl Aq. Dest.

[0140] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
	53°C	2 Minuten
	72°C	3 Minuten
1X	72°C	10 Minuten

[0141] Die PCR-Amplifikation mit SEQ 29 No. 29 und SEQ ID No. 30 resultierte in einem 1155 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert (SEQ ID No. 22). Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-Teasy (Promega) kloniert und der Klon pGKETO2 erhalten.

[0142] Sequenzierung des Klon pGKETO2 mit dem T7- und dem SP6-Primer bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in den drei Kodons 73, 114 und 119 in je einer Base von der publizierten Sequenz X86782 unterscheidet. Diese Nukleotidaustausche wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die Nukleotidsequenz im verwendeten *Haematococcus pluvialis* Stamm 192.80 (Abb. 3 und 4, Sequenzvergleiche).

[0143] Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet. Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1027 Bp SphI-Fragmentes aus pGKETO2 und Ligierung in den SphI geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der das *Haematococcus pluvialis* Ketolasegen in der korrekten Orientierung als N-terminale translationale Fusion mit der *rbcs* Transit-peptidsequenz enthält, heißt pJKETO2.

Beispiel 2: Amplifikation einer cDNA, die die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille mit einem um 14 Aminosäuren verkürztem N-terminus kodiert

[0144] Die cDNA, die für die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) mit einem um 14 Aminosäuren verkürztem N-Terminus kodiert, wurde mittels PCR aus *Haematococcus pluvialis* Suspensionskultur (Stamm 192.80 der "Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen") amplifiziert.

[0145] Die Präparation von Total-RNA aus einer Suspensionskultur von *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) erfolgte wie in Beispiel 1 beschrieben.

[0146] Die cDNA-Synthese erfolgte wie unter Beispiel 1 beschrieben.

[0147] Die Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) mit einem um 14 Aminosäuren verkürztem N-Terminus wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Haematococcus pluvialis* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR3 SEQ ID No. 31) und eines antisense spezifischen Primers (PR1 SEQ ID No. 29) amplifiziert.

[0148] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der cDNR, die für ein Ketolase Protein mit um 14 Aminosäuren verkürztem N-Terminus kodiert, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 4 µl einer *Haematococcus pluvialis* cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 mM PR1 (SEQ ID No. 29)
- 0,2 mM PR3 (SEQ ID No. 31)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25,8 µl Aq. Dest.

[0149] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
	53°C	2 Minuten
	72°C	3 Minuten
1X	72°C	10 Minuten

[0150] Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 29 und SEQ ID No. 31 resultierte in einem 1111 Bp Fragment, das für ein Ketolase Protein kodiert, bei dem N-terminalen Aminosäuren (Position 2–16) durch eine einzige Aminosäure (Leucin) ersetzt sind.

[0151] Das Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-Teasy (Promega) kloniert und der Klon pGKETO3 erhalten. Sequenzierungen mit den Primern T7- und SP6 bestätigten eine zur Sequenz SEQ ID No. 22 identische Sequenz, wobei die 5'Region (Position 1–53) der SEQ ID No. 22 im Amplifikat SEQ ID No. 24 durch eine in der Sequenz abweichende Nonamersequenz ersetzt wurde. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guérineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

[0152] Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 985 Bp SpHI Fragmentes aus pGKETO3 und Ligierung mit dem SpHI geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der die *Haematococcus pluvialis* Ketolase mit einem um 14 Aminosäuren verkürzten N-Terminus in der korrekten Orientierung als N-terminale translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heißt pJKETO3.

Beispiel 3: Amplifikation einer cDNA, die die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille (Stamm 192.80 der "Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen") bestehend aus der gesamten Primärsequenz und fusioniertem C-terminalem myc-Tag kodiert

[0153] Die cDNA, die für die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) bestehend aus der gesamten Primärsequenz und fusioniertem C-terminalem myc-Tag kodiert, wurde mittels PCR unter Verwendung des Plasmids pGKETO2 (in Beispiel 1 beschrieben) und des Primers PR15 (SEQ ID No. 32) hergestellt. Der Primer PR15 setzt sich zusammen aus einer antisense spezifischen 3'Region (Nucleotide 40–59) und einer myc-Tag kodierenden 5'Region (Nucleotide 1–39).

[0154] Die Denaturierung (5 min bei 95°C) und Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf 40°C) von pGKETO2 und PR15 erfolgte in einem 11,5 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µg pGKETO2 PlasmidDNA
- 0,1 µg PR15 (SEQ ID No. 32)

[0155] Das Auffüllen der 3'Enden (30 min bei 30°C) erfolgte in einem 20 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 11,5 µl pGKETO2/PR15-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 50 µM dNTPs
- 2 µl 1X Klenow Puffer
- 2U Klenow Enzym

[0156] Die Nukleinsäure kodierend eine Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) bestehend aus der gesamten Primärsequenz und fusioniertem C-terminalem myc-Tag wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Haematococcus pluvialis* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR2 SEQ ID No. 30) und eines antisense spezifischen Primers (PR15 SEQ ID No. 32) amplifiziert.

[0157] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der cDNA, die für ein Ketolase Protein mit fusioniertem C-terminalem myc-Tag kodiert, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl einer Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 µM PR15 (SEQ ID No. 32)
- 0,2 µM PR2 (SEQ ID No. 30)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28,8 µl Aq. Dest.

[0158] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
	53°C	1 Minute
	72°C	1 Minute
1X	72°C	10 Minuten

[0159] Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 32 und SEQ ID No. 30 resultierte in einem 1032 Bp-Fragment, das für ein Protein kodiert, bestehend aus der gesamten Primärsequenz der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* als zweifache translationale Fusion mit dem *rbcS* Transitpeptid am N-Terminus und dem myc-Tag am C-Terminus.

[0160] Das Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-Teasy (Promega) kloniert und der Klon pGKETO4 erhalten. Sequenzierungen mit den Primern T7- und SP6 bestätigten eine zur Sequenz SEQ ID No. 22 identische Sequenz, wobei die 3'-Region (Position 993-1155) der SEQ ID No. 22 im Amplifikat SEQ ID No. 26 durch eine in der abweichende Sequenz aus 39 Bp ersetzt wurde. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

[0161] Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1038 Bp EcoRI-SpHI Fragmentes aus pGKETO4 und Ligation mit dem EcoRI-SpHI geschnittenen Vektor pJIT117. Durch die Ligation entsteht eine translationale Fusion zwischen dem C-Terminus der *rbcS* Transitpeptidsequenz und dem N-Terminus der Ketolase Sequenz. Der Klon, der die *Haematococcus pluvialis* Ketolase mit fusioniertem C-terminalem myc-Tag in der korrekten Orientierung als translationale N-terminale Fusion mit dem *rbcS* Transitpeptid enthält, heißt pJKET4.

Beispiel 4: Herstellung von Expressionsvektoren zur konstitutiven Expression der *Haematococcus pluvialis* Ketolase in *Lycopersicon esculentum*

[0162] Die Expression der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *L. esculentum* erfolgte unter Kontrolle des konstitutiven Promoters d35S aus CaMV (Franck et al. 1980, Cell 21: 285-294). Die Expression erfolgte mit dem Transitpeptid *rbcS* aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715).

[0163] Die Herstellung eines Expressionsplasmides für die Agrobacteriumvermittelte Transformation der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *L. esculentum* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN3 (W002/00900).

- Zur Herstellung des Expressionsvektors pS3KETO2 wurde das 2.8 Kb SacI-XhoI Fragment aus pJKETO2 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert (Abb. 5, Konstruktkarte). In der Abb. 5 beinhaltet Fragment d35S den duplizierten 35S Promoter (747 bp), Fragment *rbcS* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment KETO2 (1027 bp) die gesamte Primärsequenz kodierend für die *Haematococcus pluvialis* Ketolase, Fragment term (761 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

- Zur Herstellung des Expressionsvektors pS3KETO3 wurde das 2.7 Kb bp SacI-XhoI Fragment aus pJKETO3 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert. (Abb. 6, Konstruktkarte). In der Abb. 6 beinhaltet Fragment d35S den duplizierten 35S Promoter (747 bp), Fragment *rbcS* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment KETO3 (985 bp) die um 14 N-terminale Aminosäuren verkürzte Primärsequenz kodierend für die *Haematococcus pluvialis* Ketolase, Fragment term (761 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

[0164] Zur Herstellung des Expressionsvektors pS3KETO4 wurde das 2.8 Kb SacI-XhoI Fragment aus pJKETO4 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert. (Abb. 7, Konstruktkarte). In der Abb. 7 beinhaltet Fragment d35S den duplizierten 35S Promoter (747 bp), Fragment *rbcS* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment KETO4 (1038 bp) die gesamte Primärsequenz codierend für die *Haematococcus pluvialis* Ketolase mit C-terminalem myc-Tag, Fragment term (761 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

Beispiel 5: Herstellung von Expressionsvektoren zur Expression der *Haematococcus pluvialis* Ketolase in *Lycopersicon esculentum*

[0165] Die Expression der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *L. esculentum* erfolgte mit dem Transitpeptid *rbcS* aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715). Die Expression erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des Promoters AP3 aus *Arabidopsis thaliana* (AL132971: Nukleotidregion 9298-10200; Hill et al. (1998) Development 125: 1711-1721).

[0166] Das DNA Fragment, das die AP3 Promoterregion -902 bis +15 aus *Arabidopsis thaliana* beinhaltet, wurde mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethoden aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) sowie der Primer PR7 (SEQ ID No. 33) und PR10 (SEQ ID No. 36) hergestellt.

[0167] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:
 Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das AP3-Promoterfragment (-902 bis +15) beinhaltet, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 100 ng genomischer DNA aus *A.thaliana*
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 mM PR7 (SEQ ID No. 33)
- 0,2 mM PR10 (SEQ ID No. 36)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0,25 µl Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28,8 µl Aq. Dest.

[0168] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
	50°C	1 Minute
	72°C	1 Minute
1X	72°C	10 Minuten

[0169] Das 922 Bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pTAP3 erhalten.

[0170] Sequenzierung des Klon pTAP3 bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in durch eine Insertion (ein G in Position 9765 der Sequenz AL132971) und einen Basenaustausch (ein G statt ein A in Position 9726 der Sequenz AL132971) von der publizierten AP3 Sequenz (AL132971, Nukleotidregion 9298-10200) unterscheidet. Diese Nukleotidunterschiede wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die tatsächliche Nukleotidsequenz in den verwendeten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen.

[0171] Die modifizierte Version AP3P wurde mittels rekombinanter PCR unter Verwendung des Plasmids pTAP3 hergestellt. Die Region 10200-9771 wurde mit den Primern PR7 (SEQ ID No. 33) und Primern PR9 (SEQ ID No. 35) amplifiziert (Amplifikat A7/9), die Region 9526-9285 wurde mit den PR8 (SEQ ID No. 34) und PR10 (SEQ ID No. 36) amplifiziert (Amplifikat A8/10).

[0172] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:
 Die PCR-Reaktionen zur Amplifikation der DNA-Fragmente, die die Regionen Region 10200-9771 und Region 9526-9285 des AP3 Promoters beinhalten, erfolgte in 50 µl Reaktionsansätzen, in denen enthalten war:

- 100 ng AP3 Amplifikat (oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 mM sense Primer (PR7 SEQ ID No. 33 bzw. PR8 SEQ ID No. 35)
- 0,2 mM antisense Primer (PR9 SEQ ID No. 35 bzw. PR10 SEQ ID No. 36)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0,25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28,8 µl Aq. Dest.

[0173] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
	50°C	1 Minute
	72°C	1 Minute
1X	72°C	10 Minuten

[0174] Die rekombinante PCR beinhaltet Annealing der sich über eine Sequenz von 25 Nukleotiden überlappenden Amplifikate A7/9 und A8/10, Vervollständigung zu einem Doppelstrang und anschließende Amplifizierung. Dadurch entsteht eine modifizierte Version des AP3 Promoters, AP3P, in dem die Positionen 9670-9526 deletiert sind. Die Denaturierung (5 min bei 95°C) und Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf 40°C) beider Amplifikate A7/9 und A8/10 erfolgte in einem 17,6 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 0,5 µg A7/9 Amplifikat
- 0,25 µg A8/10 Amplifikat

[0175] Das Auffüllen der 3'Enden (30 min bei 30°C) erfolgte in einem 20 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten

war:

- 17,6 µl A7/9 und A8/10-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 50 µM dNTPs
- 2 µl 1X Klenow Puffer
- 2U Klenow Enzym

[0176] Die Nukleinsäure, kodierend für die modifizierte Promoterversion AP3P, wurde mittels PCR unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR7 SEQ ID No. 28) und eines antisense spezifischen Primers (PR10 SEQ ID No. 36) amplifiziert.

[0177] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des AP3P Fragmentes erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 mM PR7 (SEQ ID No. 33)
- 0,2 mM PR10 (SEQ ID No. 36)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0,25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28,8 µl Aq. Dest.

[0178] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
	50°C	1 Minute
	72°C	1 Minute
-1X	72°C	10 Minuten

[0179] Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 33 und SEQ ID No. 36 resultierte in einem 778 Bp Fragment, das für die modifizierte Promoterversion AP3P kodiert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert und der Klon pTAP3P erhalten. Sequenzierungen mit den Primern T7 und M13 bestätigten eine zur Sequenz AL132971, Region 10200-9298 identische Sequenz, wobei die interne Region 9285-9526 deletiert wurde. Diese Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

[0180] Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 771 Bp SacI-HindIII Fragmentes aus pTAP3P und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter AP3P anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heißt pJAP3P.

[0181] Zur Herstellung einer Expressionskassette pJAP3PKETO2 wurde das 1027 Bp SpHI-Fragment KETO2 (in Beispiel 1 beschrieben) in den SpHI geschnittenen Vektor pJAP3P kloniert. Der Klon, der das Fragment KETO2 in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heißt pJAP3PKETO2.

[0182] Zur Herstellung einer Expressionskassette pJAP3PKETO4 wurde das 1032 Bp SpHI-EcoRI Fragment KETO4 (in Beispiel 3 beschrieben) in den SpHI-EcoRI geschnittenen Vektor pJAP3P kloniert. Der Klon, der das Fragment KETO4 in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heißt pJAP3PKETO4.

[0183] Die Herstellung eines Expressionsvektors für die Agrobacteriumvermittelte Transformation der AP3P-kontrollierten Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *L. esculentum* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN3 (W002/00900).

- Zur Herstellung des Expressionsvektors pS3AP3PKETO2 wurde das 2.8 KB bp SacI-XhoI Fragment aus pJAP3KETO2 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert (Abb. 8, Konstruktkarte). In der Abb. 8 beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment rbcS das rbcS Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment KETO2 (1027 bp) die gesamte Primärsequenz codierend für die *Haematococcus pluvialis* Ketolase, Fragment term (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.
- Zur Herstellung des Expressionsvektors pS3AP3PKETO4 wurde das 2.8 KB SacI-XhoI Fragment aus pJAP3PKETO4 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert. (Abb. 9, Konstruktkarte). In der Abb. 9 beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment rbcS das rbcS Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment KETO4 (1038 bp) die gesamte Primärsequenz codierend für die *Haematococcus pluvialis* Ketolase mit C-terminalem myc-Tag, Fragment term (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

Beispiel 6: Herstellung transgener *Lycopersicon esculentum* Pflanzen

[0184] Transformation und Regeneration von Tomatenpflanzen erfolgte nach der publizierten Methode von Ling und Mitarbeitern (Plant Cell Reports (1998), 17:843-847). Für die Varietät Microtom wurde mit höherer Kanamycin-Konzentration (100mg/L) selektioniert.

[0185] Als Ausgangsexplantat für die Transformation dienten Kotyledonen und Hypokotyle sieben bis zehn Tage alter Keimlinge der Linie Microtom. Für die Keimung wurde das Kulturmedium nach Murashige und Skoog (1962: Murashige and Skoog, 1962, Physiol. Plant 15, 473-) mit 2 % Saccharose, pH 6,1 verwendet. Die Keimung fand bei 21°C bei wenig Licht (20 bis 100 µE) statt. Nach sieben bis zehn Tagen wurden die Kotyledonen quer geteilt und die Hypokotyle in ca. 5 bis 10 mm lange Abschnitte geschnitten und auf das Medium MSBN (MS, pH 6,1, 3 % Saccharose + 1 mg/l BAP, 0,1 mg/l NAA) gelegt, das am Vortag mit suspensionskultivierten Tabakzellen beschickt wurde. Die Tabakzellen wurden luftblasenfrei mit sterilem Filterpapier abgedeckt. Die Vorkultur der Explantate auf dem beschriebenen Medium erfolgte für drei bis fünf Tage. Zellen des Stammes Agrobacterium tumefaciens LBA4404 wurden einzeln mit den Plasmiden pS3KETO2, pS3KETO3 bzw. pS3AP3KETO2 transformiert. Von den einzelnen mit den Binaervektoren pS3KETO2, pS3KETO3 bzw. pS3KETO2 transformierten Agrobacterium-Stämmen wurde jeweils eine Übernachtskultur in YEB Medium mit Kanamycin (20 mg/l) bei 28 Grad Celsius kultiviert und die Zellen zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde mit flüssigem MS Medium (3 % Saccharose, pH 6,1) resuspendiert und auf eine optische Dichte von 0,3 (bei 600 nm) eingestellt. Die vorkultivierten Explantate wurden in die Suspension überführt und für 30 Minuten bei Zimmertemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Explantate mit sterilem Filterpapier getrocknet und für die dreitägige Co-Kultur (21°C) auf ihr Vorkulturmedium zurück gelegt.

[0186] Nach der Co-Kultur wurden die Explantate auf MSZ2 Medium (MS pH 6,1 + 3 % Saccharose, 2 mg/l Zeatin, 100 mg/l Kanamycin, 160 mg/l Timentin) transferiert und für die selektive Regeneration bei 21°C unter Schwachlicht Bedingungen (20 bis 100 µE, Lichtrythmus 16 h / 8 h) aufbewahrt. Alle zwei bis drei Wochen erfolgte der Transfer der Explantate bis sich Sprosse bildeten. Kleine Sprosse konnten vom Explantat abgetrennt werden und auf MS (pH 6,1 + 3 % Saccharose) 160 mg/l Timentin, 30 mg/l Kanamycin, 0,1 mg/l IAA bewurzelt werden. Bewurzelte Pflanzen wurden ins Gewächshaus überführt.

[0187] Gemäß der oben beschriebenen Transformationsmethode wurden mit folgenden Expressionskonstrukten folgende Linien erhalten: Mit pS3KETO2 wurde erhalten: cs13-24, cs13-30, cs13-40.

[0188] Mit pS3KETO3 wurde erhalten: cs14-2, cs14-3, cs14-9, cs14-19.

[0189] Mit pS3AP3KETO2 wurde erhalten: cs16-15, cs16-34, cs16-35, cs16-40.

Beispiel 8: Charakterisierung der transgenen Früchte

[0190] Das Fruchtmaterial der transgenen Pflanzen wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert und das Pulver (etwa 250 bis 500 mg) mit 100 % Aceton extrahiert (dreimal je 500 µl). Das Lösungsmittel wurde evaporiert und die Carotinoide in 100 µl Aceton resuspendiert.

[0191] Mittels einer C30-reverse phase-Säule konnte zwischen Mono- und Diestern der Carotinoide unterschieden werden. HPLC-Laufbedingungen waren nahezu identisch mit einer publizierten Methode (Frazer et al. (2000), Plant Journal 24(4): 551-558).

[0192] Eine Identifizierung der Carotinoide war aufgrund der W-VIS-Spektren möglich.

[0193] Tabelle 1 zeigt das Carotinoidprofil in Tomatenfrüchten der gemäß der vorstehend beschriebenen Beispiele hergestellten transgenen Tomaten und Kontrolltomatenpflanzen. Im Vergleich zur genetisch nicht veränderten Kontrollpflanze weisen die genetisch veränderten Pflanzen einen Gehalt an Ketocarotinoiden und insbesondere einen Gehalt an Astaxanthin auf.

Tabelle 1

Pflanze	Lutein	Lycopin	beta-Carotin	Cryptoxanthin	Canthaxanthin	Adonirubin	Astaxanthin
Kontrolle	+	+	+	(+)	-	-	-
Kontrolle	+	+	+	(+)	-	-	-
CS13-24	-	+	+	(+)	+	+	+
CS13-30	-	+	+	(+)	+	+	+
CS13-40	-	+	+	(+)	+	+	+
CS14-2	-	+	+	(+)	+	+	+
CS14-3	-	+	+	-	+	+	+
CS14-9	-	+	+	(+)	+	+	+
CS14-19	-	+	+	-	+	+	+
CS16-15	-	+	+	(+)	+	+	+
CS16-34	-	+	+	(+)	+	+	+
CS16-35	-	+	+	-	+	+	+
CS16-40	-	+	(+)	(+)	+	+	+

- + bedeutet Carotinoid nachweisbar
 - bedeutet Carotinoid nicht detektiert
 (+) bedeutet Carotinoidkonzentration an der Nachweisgrenze

SEQUENCE LISTING

<110> SunGene GmbH Co. KGaA

<120> verfahren zur herstellung von Astaxanthin in Fruechten von Pflanzen

<130> NAE 365/02

<160> 36

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1771

<212> DNA

<213> Haematococcus pluvialis

<220>

<221> CDS

<222> (166)..(1155)

<223>

<400> 1
 ggcacgagct tgcacgcaag tcagegcgcg caagtcaaca cctgccggtc cacagcctca 60
 aataataaag agctcaagcg tttgtgcgcc tcgacgtggc cagtctgcac tgccttgaac 120
 ccgcgagtct cccgccgcac tgactgccat agcacagcta gacga atg cag cta gca 177
 Met Gln Leu Ala
 1
 gcg aca gta atg ttg gag cag ctt acc gga agc gct gag gca ctc aag 225
 Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala Glu Ala Leu Lys
 5 10 15 20
 gag aag gag aag gag gtt gca ggc agc tct gac gtg ttg cgt aca tgg 273
 Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val Leu Arg Thr Trp
 25 30 35
 gcg acc cag tac tcg ctt ccg tca gaa gag tca gac gcg gcc cgc ccg 321
 Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp Ala Ala Arg Pro
 40 45 50
 gga ctg aag aat gcc tac aag cca cca cct tcc gac aca aag ggc atc 369
 Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp Thr Lys Gly Ile
 55 60 65
 aca atg gcg cta cgt gtc atc ggc tcc tgg gcc gca gtg ttc ctc cac 417
 Thr Met Ala Leu Arg Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala Val Phe Leu His
 70 75 80
 gcc att ttt caa atc aag ctt ccg acc tcc ttg gac cag ctg cac tgg 465
 Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp Gln Leu His Trp
 85 90 95 100
 ctg ccc gtg tca gat gcc aca gct cag ctg gtt agc ggc acg agc agc 513

Leu	Pro	Val	Ser	Asn	Ala	Thr	Ala	Gln	Leu	Val	Ser	Gly	Thr	Ser	
				105					110						
ctg	ctc	gac	atc	gtc	gta	gta	ttc	ttt	gtc	ctg	gag	ttc	ctg	tac	aca
Leu	Leu	Asp	Ile	Val	Val	Val	Phe	Phe	Val	Leu	Glu	Phe	Leu	Tyr	Thr
			120					125						130	
ggc	ctt	ttt	atc	acc	acg	cat	gat	gct	atg	cat	ggc	acc	atc	gcc	atg
Gly	Leu	Phe	Ile	Thr	Thr	His	Asp	Ala	Met	His	Gly	Thr	Ile	Ala	Met
		135					140					145			
aga	aac	agg	cag	ctt	aat	gac	ttc	ttg	ggc	aga	gta	tgc	atc	tcc	ttg
Arg	Asn	Arg	Gln	Leu	Asn	Asp	Phe	Leu	Gly	Arg	Val	Cys	Ile	Ser	Leu
	150					155					160				
tac	gcc	tgg	ttt	gat	tac	aac	atg	ctg	cac	cgc	aag	cat	tgg	gag	cac
Tyr	Ala	Trp	Phe	Asp	Tyr	Asn	Met	Leu	His	Arg	Lys	His	Trp	Glu	His
	165				170					175					180
cac	aac	cac	act	ggc	gag	gtg	ggc	aag	gac	cct	gac	ttc	cac	agg	gga
His	Asn	His	Thr	Gly	Glu	Val	Gly	Lys	Asp	Pro	Asp	Phe	His	Arg	Gly
				185					190					195	
aac	cct	ggc	att	gtg	ccc	tgg	ttt	gcc	agc	ttc	atg	tcc	agc	tac	atg
Asn	Pro	Gly	Ile	Val	Pro	Trp	Phe	Ala	Ser	Phe	Met	Ser	Ser	Tyr	Met
			200					205					210		
tcg	atg	tgg	cag	ttt	gcg	cgc	ctc	gca	tgg	tgg	acg	gtg	gtc	atg	cag
Ser	Met	Trp	Gln	Phe	Ala	Arg	Leu	Ala	Trp	Trp	Thr	Val	Val	Met	Gln
		215					220						225		
ctg	ctg	ggt	gcg	cca	atg	gcg	aac	ctg	ctg	gtg	ttc	atg	gcg	gcc	gcg
Leu	Leu	Gly	Ala	Pro	Met	Ala	Asn	Leu	Leu	Val	Phe	Met	Ala	Ala	Ala
		230					235					240			
ccc	atc	ctg	tcc	gcc	ttc	cgc	ttg	ttc	tac	ttt	ggc	acg	tac	atg	ccc
Pro	Ile	Leu	Ser	Ala	Phe	Arg	Leu	Phe	Tyr	Phe	Gly	Thr	Tyr	Met	Pro
					250					255					260
cac	aag	cct	gag	cct	ggc	gcc	gcg	tca	ggc	tct	tca	cca	gcc	gtc	atg
His	Lys	Pro	Glu	Pro	Gly	Ala	Ala	Ser	Gly	Ser	Ser	Pro	Ala	Val	Met
				265					270					275	
aac	tgg	tgg	aag	tcg	cgc	act	agc	cag	gcg	tcc	gac	ctg	gtc	agc	ttt
Asn	Trp	Trp	Lys	Ser	Arg	Thr	Ser	Gln	Ala	Ser	Asp	Leu	Val	Ser	Phe
				280				285					290		
ctg	acc	tgc	tac	cac	ttc	gac	ctg	cac	tgg	gag	cac	cac	cgc	tgg	ccc
Leu	Thr	Cys	Tyr	His	Phe	Asp	Leu	His	Trp	Glu	His	His	Arg	Trp	Pro
		295					300					305			
ttc	gcc	ccc	tgg	tgg	gag	ctg	ccc	aac	tgc	cgc	cgc	ctg	tct	ggc	cga
Phe	Ala	Pro	Trp	Trp	Glu	Leu	Pro	Asn	Cys	Arg	Arg	Leu	Ser	Gly	Arg
		310					315				320				

325

gctgggcatg caggttgtgg caggactggg tgaggtgaaa agctgcaggc gctgctgccg 1245
 gacacgctgc atgggctacc ctgtgtagct gccgccacta ggggaggggg tttgtagctg 1305
 tcgagcttgc cccatggatg aagctgtgta gtggtgcagg gactacaccc acaggccaac 1365
 acccttgacg gagatgtctt gcgtcgggag gagtgttggg cagtgtagat gctatgattg 1425
 tatcttaatg ctgaagcctt taggggagcg acacttagtg ctgggcaggc aacgccctgc 1485
 aaggtgcagg cacaagctag gctggacgag gactcgggtg caggcaggtg aagaggtgcg 1545
 ggaggggtgt gccacacca ctgggcaaga ccatgctgca atgctggcgg tgtggcagtg 1605
 agagctgcgt gattaactgg gctatggatt gtttgagcag tctcattat tctttgatat 1665
 agatactggt caggcaggtc aggagagtga gtatgaacaa gttgagaggt ggtgcgctgc 1725
 ccctgcgctt atgaagctgt aacaataaag tggttcaaaa aaaaaa 1771

<210> 2

<211> 329

<212> PRT

<213> Haematococcus pluvialis

<400> 2

Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala
 1 5 10 15

Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val
 20 25 30

Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp
 35 40 45

Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp
 50 55 60

Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Arg Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala
 65 70 75 80

Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp
 85 90 95

Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser
 100 105 110

Gly Thr Ser Ser Leu Asp Ile Val Val Val Phe Phe Leu Glu
 115 120 125

Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly
 130 135 140

Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val
 145 150 155 160

Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys
 165 170 175

His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp
 180 185 190

Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met
 195 200 205

Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr
 210 215 220

Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe
 225 230 235 240

Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly
 245 250 255

Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser
 260 265 270

Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp
 275 280 285

Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His
 290 295 300

His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg
 305 310 315 320

Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala
 325

<210> 3
 <211> 1662
 <212> DNA
 <213> Haematococcus pluvialis

<220>
 <221> CDS
 <222> (168)..(1130)
 <223>

<400> 3
 cggggcgaact caagaaattc aacagctgca agcgcgcccc agcctcacag cgccaagtga 60
 gctatcgacg tggttgtgag cgctcgacgt ggtccactga cgggectgtg agcctctgcg 120
 ctccgtcctc tgccaaatct cgcgtcgggg cctgcctaag tcgaaga atg cac gtc 176
 Met His Val
 1
 gca tcg gca cta atg gtc gag cag aaa ggc agt gag gca gct gct tcc 224
 Ala Ser Ala Leu Met Val Glu Gln Lys Gly Ser Glu Ala Ala Ala Ser
 5 10 15
 agc cca gac gtc ttg aga gcg tgg gcg aca cag tat cac atg cca tcc 272
 Ser Pro Asp Val Leu Arg Ala Trp Ala Thr Gln Tyr His Met Pro Ser
 20 25 30 35
 gag tcg tca gac gca gct cgt cct gcg cta aag cac gcc tac aaa cct 320
 Glu Ser Ser Asp Ala Ala Arg Pro Ala Leu Lys His Ala Tyr Lys Pro
 40 45 50
 cca gca tct gac gcc aag ggc atc acg atg gcg ctg acc atc att ggc 368
 Pro Ala Ser Asp Ala Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Thr Ile Ile Gly
 55 60 65
 acc tgg acc gca gtg ttt tta cac gca ata ttt caa atc agg cta ccg 416
 Thr Trp Thr Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Arg Leu Pro
 70 75 80
 aca tcc atg gac cag ctt cac tgg ttg cct gtg tcc gaa gcc aca gcc 464
 Thr Ser Met Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Glu Ala Thr Ala
 85 90 95
 cag ctt ttg ggc gga agc agc agc cta ctg cac atc gct gca gtc ttc 512
 Gln Leu Leu Gly Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Ala Ala Val Phe
 100 105 110 115
 att gta ctt gag ttc ctg tac act ggt cta ttc atc acc aca cat gac 560
 Ile Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp
 120 125 130
 gca atg cat ggc acc ata gct ttg agg cac agg cag ctc aat gat ctc 608
 Ala Met His Gly Thr Ile Ala Leu Arg His Arg Gln Leu Asn Asp Leu
 135 140 145
 ctt ggc aac atc tgc ata tca ctg tac gcc tgg ttt gac tac agc atg 656

Leu Gly Asn Ile Cys Leu Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Met	
150 155 160	
ctg cat cgc aag cac tgg gag cac cac aac cat act ggc gaa gtg ggg	704
Leu His Arg Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly	
165 170 175	
aaa gac cct gac ttc cac aag gga aat ccc ggc ctt gtc ccc tgg ttc	752
Lys Asp Pro Asp Phe His Lys Gly Asn Pro Gly Leu Val Pro Trp Phe	
180 185 190 195	
gcc agc ttc atg tcc agc tac atg tcc ctg tgg cag ttt gcc cgg ctg	800
Ala Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Leu Trp Gln Phe Ala Arg Leu	
200 205 210	
gca tgg tgg gca gtg gtg atg caa atg ctg ggg gcg ccc atg gca aat	848
Ala Trp Trp Ala Val Val Met Gln Met Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn	
215 220 225	
ctc cta gtc ttc atg gct gca gcc cca atc ttg tca gca ttc cgc ctc	896
Leu Leu Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu	
230 235 240	
ttc tac ttc ggc act tac ctg cca cac aag cct gag cca ggc cct gca	944
Phe Tyr Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Pro Ala	
245 250 255	
gca ggc tct cag gtg atg gcc tgg ttc agg gcc aag aca agt gag gca	992
Ala Gly Ser Gln Val Met Ala Trp Phe Arg Ala Lys Thr Ser Glu Ala	
260 265 270 275	
tct gat gtg atg agt ttc ctg aca tgc tac cac ttt gac ctg cac tgg	1040
Ser Asp Val Met Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp	
280 285 290	
gag cac cac agg tgg ccc ttt gcc ccc tgg tgg cag ctg ccc cac tgc	1088
Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Gln Leu Pro His Cys	
295 300 305	
cgc cgc ctg tcc ggg cgt ggc ctg gtg cct gcc ttg gca tga	1130
Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Leu Ala	
310 315 320	
cctggctccct ccgctgggtga cccagcgtct gcacaagagt gtcattgctac aggggtgctgc	1190
ggccagtggtg agcgagtgct actctcagcc tgtatggggc taccgctgtg ccaactgagca	1250
ctgggcatgc cactgagcac tgggcgtgct actgagcaat gggcgtgcta ctgagcaatg	1310
ggcgtgctac tgacaatggg cgtgctactg gggctctggca gtggctagga tggagtttga	1370
tgcattcagt agcgggtggcc aacgtcatgt ggatgggtgga agtgctgagg ggttttaggca	1430
gccggcattt gagagggcta agttataaat cgcattgctgc tcatgcgcac atatctgcac	1490
acagccaggg aaatcccttc gagagtgatt atgggacact tgtattgggt tcgtgctatt	1550

gtttttattca gcagcagtac ttagtgaggg tgagagcagg gtggtgaga ggagtgagt 1610
 gagtatgaac ctggtcagcg aggtgaacag cctgtaatga atgactctgt ct 1662

<210> 4
 <211> 320
 <212> PRT
 <213> Haematococcus pluvialis

<400> 4

Met His Val Ala Ser Ala Leu Met Val Glu Gln Lys Gly Ser Glu Ala
 1 5 10 15

Ala Ala Ser Ser Pro Asp Val Leu Arg Ala Trp Ala Thr Gln Tyr His
 20 25 30

Met Pro Ser Glu Ser Ser Asp Ala Ala Arg Pro Ala Leu Lys His Ala
 35 40 45

Tyr Lys Pro Pro Ala Ser Asp Ala Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Thr
 50 55 60

Ile Ile Gly Thr Trp Thr Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile
 65 70 75 80

Arg Leu Pro Thr Ser Met Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Glu
 85 90 95

Ala Thr Ala Gln Leu Leu Gly Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Ala
 100 105 110

Ala Val Phe Ile Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr
 115 120 125

Thr His Asp Ala Met His Gly Thr Ile Ala Leu Arg His Arg Gln Leu
 130 135 140

Asn Asp Leu Leu Gly Asn Ile Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp
 145 150 155 160

Tyr Ser Met Leu His Arg Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly
 165 170 175

Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp Phe His Lys Gly Asn Pro Gly Leu Val

180

185

19

Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Leu Trp Gln Phe
195 200 205

Ala Arg Leu Ala Trp Trp Ala Val Val Met Gln Met Leu Gly Ala Pro
210 215 220

Met Ala Asn Leu Leu Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala
225 230 235 240

Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Glu Pro
245 250 255

Gly Pro Ala Ala Gly Ser Gln Val Met Ala Trp Phe Arg Ala Lys Thr
260 265 270

Ser Glu Ala Ser Asp Val Met Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp
275 280 285

Leu His Trp Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Gln Leu
290 295 300

Pro His Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Leu Ala
305 310 315 320

<210> 5
<211> 729
<212> DNA
<213> Agrobacterium aurantiacum

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(729)
<223>

<400> 5
atg agc gca cat gcc ctg ccc aag gca gat ctg acc gcc acc agc ctg 48
Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu
1 5 10 15

atc gtc tcg ggc ggc atc atc gcc gct tgg ctg gcc ctg cat gtg cat 96
Ile Val Ser Gly Gly Ile Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His
20 25 30

gcg ctg tgg ttt ctg gac gca gcg gcg cat ccc atc ctg gcg atc gca 144
Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Ile Ala

35	40	45	
aat ttc ctg ggg ctg acc tgg ctg tcg gtc gga ttg ttc atc atc gcg Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala 50 55 60			192
cat gac gcg atg cac ggg tgg gtg gtg ccg ggg cgt ccg cgc gcc aat His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn 65 70 75 80			240
gcg gcg atg ggc cag ctt gtc ctg tgg ctg tat gcc gga ttt tgg tgg Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp 85 90 95			288
cgc aag atg atc gtc aag cac atg gcc cat cac cgc cat gcc gga acc Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr 100 105 110			336
gac gac gac ccc gat ttc gac cat ggc ggc ccg gtc cgc tgg tac gcc Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala 115 120 125			384
cgc ttc atc ggc acc tat ttc ggc tgg cgc gag ggg ctg ctg ctg ccc Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro 130 135 140			432
gtc atc gtg acg gtc tat gcg ctg atc ctt ggg gat cgc tgg atg tac Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr 145 150 155 160			480
gtg gtc ttc tgg ccg ctg ccg tgg atc ctg gcg tgg atc cag ctg ttc Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe 165 170 175			528
gtg ttc ggc acc tgg ctg ccg cac cgc ccc ggc cac gac gcg ttc ccg Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro 180 185 190			576
gac cgc cac aat gcg cgg tgg tgg ccg atc agc gac ccc gtg tgg ctg Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu 195 200 205			624
ctg acc tgc ttt cac ttt ggc ggt tat cat cac gaa cac cac ctg cac Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His 210 215 220			672
ccg acg gtg ccg tgg tgg cgc ctg ccc agc acc cgc acc aag ggg gac Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp 225 230 235 240			720
acc gca tga Thr Ala			729

<210> 6
<211> 242

<212> PRT
 <213> Agrobacterium aurantiacum

<400> 6

Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu
 1 5 10 15

Ile Val Ser Gly Gly Ile Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His
 20 25 30

Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Ile Ala
 35 40 45

Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala
 50 55 60

His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn
 65 70 75 80

Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp
 85 90 95

Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr
 100 105 110

Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala
 115 120 125

Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro
 130 135 140

Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr
 145 150 155 160

Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe
 165 170 175

Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro
 180 185 190

Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu
 195 200 205

Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His
 210 215 220

Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp
 225 230 235 240

Thr Ala

<210> 7
 <211> 1631
 <212> DNA
 <213> Alcaligenes sp.

<220>
 <221> CDS
 <222> (99)..(827)
 <223>

<400> 7
 ctgcaggccg ggcccgggtgg ccaatggtcg caaccggcag gactggaaca ggacggcggg 60
 ccggtctagg ctgtcgccct acgcagcagg agtttcgg atg tcc gga cgg aag, cct 116
 Met Ser Gly Arg Lys Pro
 1 5
 ggc aca act ggc gac acg atc gtc aat ctc ggt ctg acc gcc gcg atc 164
 Gly Thr Thr Gly Asp Thr Ile Val Asn Leu Gly Leu Thr Ala Ala Ile
 10 15 20
 ctg ctg tgc tgg ctg gtc ctg cac gcc ttt acg cta tgg ttg cta gat 212
 Leu Leu Cys Trp Leu Val Leu His Ala Phe Thr Leu Trp Leu Leu Asp
 25 30 35
 gcg gcc gcg cat ccg ctg ctt gcc gtg ctg tgc ctg gct ggg ctg acc 260
 Ala Ala Ala His Pro Leu Leu Ala Val Leu Cys Leu Ala Gly Leu Thr
 40 45 50
 tgg ctg tgc gtc ggg ctg ttc atc atc gcg cat gac gca atg cac ggg 308
 Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala His Asp Ala Met His Gly
 55 60 65 70
 tcc gtg gtg ccg ggg cgg ccg cgc gcc aat gcg gcg atc ggg caa ctg 356
 Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn Ala Ala Ile Gly Gln Leu
 75 80 85
 gcg ctg tgg ctc tat gcg ggg ttc tgc tgg ccc aag ctg atc gcc aag 404
 Ala Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp Pro Lys Leu Ile Ala Lys
 90 95 100
 cac atg acg cat cac cgg cac gcc ggc acc gac aac gat ccc gat ttc 452
 His Met Thr His His Arg His Ala Gly Thr Asp Asn Asp Pro Asp Phe
 105 110 115

ggt cac gga ggg ccc ggg cgc tgg tac ggc agc ttc gtc tcc aac tat Gly His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Gly Ser Phe Val Ser Thr Tyr 120 125 130	500
ttc ggc tgg cga gag gga ctg ctg cta ccg gtg atc gtc acc acc tat Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro Val Ile Val Thr Thr Tyr 135 140 145 150	548
gcg ctg atc ctg ggc gat cgc tgg atg tat gtc atc ttc tgg ccg gtc Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr Val Ile Phe Trp Pro Val 155 160 165	596
ccg gcc gtt ctg gcg tcg atc cag att ttc gtc ttc gga act tgg ctg Pro Ala Val Leu Ala Ser Ile Gln Ile Phe Val Phe Gly Thr Trp Leu 170 175 180	644
ccc cac cgc ccg gga cat gac gat ttt ccc gac cgg cac aac gcg agg Pro His Arg Pro Gly His Asp Asp Phe Pro Asp Arg His Asn Ala Arg 185 190 195	692
tcg acc ggc atc ggc gac ccg ttg tca cta ctg acc tgc ttc cat ttc Ser Thr Gly Ile Gly Asp Pro Leu Ser Leu Leu Thr Cys Phe His Phe 200 205 210	740
ggc ggc tat cac cac gaa cat cac ctg cat ccg cat gtg ccg tgg tgg Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His Pro His Val Pro Trp Trp 215 220 225 230	788
cgc ctg cct cgt aca cgc aag acc gga ggc cgc gca tga cgcaattcct Arg Leu Pro Arg Thr Arg Lys Thr Gly Gly Arg Ala 235 240	837
cattgtcgtg ggcacagtc tcgtgatgga gctgaccgcc tattccgtcc accgctggat	897
tatgcacggc cccctaggct ggggctggca caagtcccat cacgaagagc acgaccacgc	957
gttgaggaaag aacgacctct acggcgtcgt cttcgcgggtg ctggcgacga tcctcttcac	1017
cgtgggcgcc tattggtggc cgggtgctgtg gtggatcgcc ctgggcatga cggctctatgg	1077
gttgatctat ttcattcctgc acgacgggct tgtgcatcaa cgctggccgt ttcggtatat	1137
tcogcggcgg ggctatttcc gcaggctcta ccaagctcat cgcttgcacc acgcggtcga	1197
ggggcgggac cactgcgtca gcttcggctt catctatgcc ccaccctggg acaagctgaa	1257
gcaggatctg aagcggtcgg gtgtcctgcg cccccaggac gagcgtccgt cgtgatctct	1317
gatccccggc tggccgcatg aaatccgacg tgctgctggc aggggcgggc cttgccaacg	1377
gactgatcgc gctggcgatc cgcaaggcgc ggcccgacct tcgcgtgctg ctgctggacc	1437
gtgcggcggg cgcctcggac gggcatactt ggtcctgcca cgacaccgat ttggcgccgc	1497
actggctgga ccgcctgaag ccgatcaggc gtggcgactg gcccgatcag gaggtgcggt	1557

tcccagacca ttgcgaagg ctccgggccc gatatggctc gatcgacggg cgggggctga 1617
 tgcgtgcggt gacc 1631

<210> 8
 <211> 242
 <212> PRT
 <213> Alcaligenes sp.

<400> 8

Met Ser Gly Arg Lys Pro Gly Thr Thr Gly Asp Thr Ile Val Asn Leu
 1 5 10 15

Gly Leu Thr Ala Ala Ile Leu Leu Cys Trp Leu Val Leu His Ala Phe
 20 25 30

Thr Leu Trp Leu Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Leu Leu Ala Val Leu
 35 40 45

Cys Leu Ala Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala
 50 55 60

His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn
 65 70 75 80

Ala Ala Ile Gly Gln Leu Ala Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp
 85 90 95

Pro Lys Leu Ile Ala Lys His Met Thr His His Arg His Ala Gly Thr
 100 105 110

Asp Asn Asp Pro Asp Phe Gly His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Gly
 115 120 125

Ser Phe Val Ser Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro
 130 135 140

Val Ile Val Thr Thr Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr
 145 150 155 160

Val Ile Phe Trp Pro Val Pro Ala Val Leu Ala Ser Ile Gln Ile Phe
 165 170 175

Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Asp Phe Pro

180

185

190

Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Thr Gly Ile Gly Asp Pro Leu Ser Leu
195 200 205

Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His
210 215 220

Pro His Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Arg Thr Arg Lys Thr Gly Gly
225 230 235 240

Arg Ala

<210> 9
<211> 729
<212> DNA
<213> *Paracoccus marcusii*

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(729)
<223>

<400> 9
atg agc gca cat gcc ctg ccc aag gca gat ctg acc gcc aca agc ctg 48
Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu
1 5 10 15
atc gtc tcg ggc ggc atc atc gcc gca tgg ctg gcc ctg cat gtg cat 96
Ile Val Ser Gly Gly Ile Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His
20 25 30
gcg ctg tgg ttt ctg gac gcg gcg gcc cat ccc atc ctg gcg gtc gcg 144
Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Val Ala
35 40 45
aat ttc ctg ggg ctg acc tgg ctg tcg gtc gga ttg ttc atc atc gcg 192
Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala
50 55 60
cat gac gcg atg cac ggg tcg gtc gtg ccg ggg cgt ccg cgc gcc aat 240
His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn
65 70 75 80
gcg gcg atg ggc cag ctt gtc ctg tgg ctg tat gcc gga ttt tcg tgg 288
Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp
85 90 95
cgc aag atg atc gtc aag cac atg gcc cat cac cgc cat gcc gga acc 336
Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr

100	105	110	
gac gac gac cca gat ttc gac cat ggc ggc ccg gtc cgc tgg tac gcc			384
Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala			
115	120	125	
cgc ttc atc ggc acc tat ttc ggc tgg cgc gag ggg ctg ctg ctg ccc			432
Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro			
130	135	140	
gtc atc gtg acg gtc tat gcg ctg atc ctg ggg gat cgc tgg atg tac			480
Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr			
145	150	155	160
gtg gtc ttc tgg ccg ttg ccg tcg atc ctg gcg tcg atc cag ctg ttc			528
Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe			
165	170	175	
gtg ttc ggc act tgg ctg ccg cac cgc ccc ggc cac gac gcg ttc ccg			576
Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro			
180	185	190	
gac cgc cat aat gcg ccg tcg tcg ccg atc agc gac cct gtg tcg ctg			624
Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu			
195	200	205	
ctg acc tgc ttt cat ttt ggc ggt tat cat cac gaa cac cac ctg cac			672
Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His			
210	215	220	
ccg acg gtg ccg tgg tgg cgc ctg ccc agc acc cgc acc aag ggg gac			720
Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp			
225	230	235	240
acc gca tga			729
Thr Ala			

<210> 10
 <211> 242
 <212> PRT
 <213> Paracoccus marcusii
 <400> 10

Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu
1 5 10 15

Ile Val Ser Gly Gly Ile Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His
20 25 30

Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Val Ala
35 40 45

Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala
 50 55 60
 His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn
 65 70 75 80
 Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp
 85 90 95
 Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr
 100 105 110
 Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala
 115 120 125
 Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro
 130 135 140
 Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr
 145 150 155 160
 Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe
 165 170 175
 Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro
 180 185 190
 Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu
 195 200 205
 Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His
 210 215 220
 Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp
 225 230 235 240
 Thr Ala

<210> 11
 <211> 1629
 <212> DNA
 <213> Synechococcus sp.

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1629)
 <223>

<400> 11
 atg atc acc acc gat gtt gtc att att ggg gcg ggg cac aat ggc tta 48
 Met Ile Thr Thr Asp Val Val Ile Ile Gly Ala Gly His Asn Gly Leu
 1 5 10 15
 gtc tgt gca gcc tat ttg ctc caa cgg ggc ttg ggg gtg acg tta cta 96
 Val Cys Ala Ala Tyr Leu Leu Gln Arg Gly Leu Gly Val Thr Leu Leu
 20 25 30
 gaa aag cgg gaa gta cca ggg ggg gcg gcc acc aca gaa gct ctc atg 144
 Glu Lys Arg Glu Val Pro Gly Gly Ala Ala Thr Thr Glu Ala Leu Met
 35 40 45
 ccg gag cta tcc ccc cag ttt cgc ttt aac cgc tgt gcc att gac cac 192
 Pro Glu Leu Ser Pro Gln Phe Arg Phe Asn Arg Cys Ala Ile Asp His
 50 55 60
 gaa ttt atc ttt ctg ggg ccg gtg ttg cag gag cta aat tta gcc cag 240
 Glu Phe Ile Phe Leu Gly Pro Val Leu Gln Glu Leu Asn Leu Ala Gln
 65 70 75 80
 tat ggt ttg gaa tat tta ttt tgt gac ccc agt gtt ttt tgt ccg ggg 288
 Tyr Gly Leu Glu Tyr Leu Phe Cys Asp Pro Ser Val Phe Cys Pro Gly
 85 90 95
 ctg gat ggc caa gct ttt atg agc tac cgt tcc cta gaa aaa acc tgt 336
 Leu Asp Gly Gln Ala Phe Met Ser Tyr Arg Ser Leu Glu Lys Thr Cys
 100 105 110
 gcc cac att gcc acc tat agc ccc cga gat gcg gaa aaa tat cgg caa 384
 Ala His Ile Ala Thr Tyr Ser Pro Arg Asp Ala Glu Lys Tyr Arg Gln
 115 120 125
 ttt gtc aat tat tgg acg gat ttg ctc aac gct gtc cag cct gct ttt 432
 Phe Val Asn Tyr Trp Thr Asp Leu Leu Asn Ala Val Gln Pro Ala Phe
 130 135 140
 aat gct ccg ccc cag gct tta cta gat tta gcc ctg aac tat ggt tgg 480
 Asn Ala Pro Pro Gln Ala Leu Leu Asp Leu Ala Leu Asn Tyr Gly Trp
 145 150 155 160
 gaa aac tta aaa tcc gtg ctg gcg atc gcc ggg tcg aaa acc aag gcg 528
 Glu Asn Leu Lys Ser Val Leu Ala Ile Ala Gly Ser Lys Thr Lys Ala
 165 170 175
 ttg gat ttt atc cgc act atg atc ggc tcc ccg gaa gat gtg ctc aat 576
 Leu Asp Phe Ile Arg Thr Met Ile Gly Ser Pro Glu Asp Val Leu Asn
 180 185 190
 gaa tgg ttc gac agc gaa cgg gtt aaa gct cct tta gct aga cta tgt 624

Glu	Trp	Phe	Asp	Ser	Glu	Arg	Val	Lys	Ala	Pro	Leu	Ala	Arg	Leu	Asn		
		195					200						205				
tcg	gaa	att	ggc	gct	ccc	cca	tcc	caa	aag	ggt	agt	agc	tcc	ggc	atg		672
Ser	Glu	Ile	Gly	Ala	Pro	Pro	Ser	Gln	Lys	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Met		
	210					215				220							
atg	atg	gtg	gcc	atg	cgg	cat	ttg	gag	gga	att	gcc	aga	cca	aaa	gga		720
Met	Met	Val	Ala	Met	Arg	His	Leu	Glu	Gly	Ile	Ala	Arg	Pro	Lys	Gly		
225					230				235					240			
ggc	act	gga	gcc	ctc	aca	gaa	gcc	ttg	gtg	aag	tta	gtg	caa	gcc	caa		768
Gly	Thr	Gly	Ala	Leu	Thr	Glu	Ala	Leu	Val	Lys	Leu	Val	Gln	Ala	Gln		
				245					250					255			
ggg	gga	aaa	atc	ctc	act	gac	caa	acc	gtc	aaa	cgg	gta	ttg	gtg	gaa		816
Gly	Gly	Lys	Ile	Leu	Thr	Asp	Gln	Thr	Val	Lys	Arg	Val	Leu	Val	Glu		
			260					265					270				
aac	aac	cag	gcg	atc	ggg	gtg	gag	gta	gct	aac	gga	gaa	cag	tac	cgg		864
Asn	Asn	Gln	Ala	Ile	Gly	Val	Glu	Val	Ala	Asn	Gly	Glu	Gln	Tyr	Arg		
		275					280					285					
gcc	aaa	aaa	ggc	gtg	att	tct	aac	atc	gat	gcc	cgc	cgt	tta	ttt	ttg		912
Ala	Lys	Lys	Gly	Val	Ile	Ser	Asn	Ile	Asp	Ala	Arg	Arg	Leu	Phe	Leu		
	290					295				300							
caa	ttg	gtg	gaa	cgg	ggg	gcc	cta	gcc	aag	gtg	aat	caa	aac	cta	ggg		960
Gln	Leu	Val	Glu	Pro	Gly	Ala	Leu	Ala	Lys	Val	Asn	Gln	Asn	Leu	Gly		
305					310					315				320			
gaa	cga	ctg	gaa	cgg	cgc	act	gtg	aac	aat	aac	gaa	gcc	att	tta	aaa		1008
Glu	Arg	Leu	Glu	Arg	Arg	Thr	Val	Asn	Asn	Asn	Glu	Ala	Ile	Leu	Lys		
				325					330					335			
atc	gat	tgt	gcc	ctc	tcc	ggt	tta	ccc	cac	ttc	act	gcc	atg	gcc	ggg		1056
Ile	Asp	Cys	Ala	Leu	Ser	Gly	Leu	Pro	His	Phe	Thr	Ala	Met	Ala	Gly		
			340					345					350				
cgg	gag	gat	cta	acg	gga	act	att	ttg	att	gcc	gac	tgg	gta	cgc	cat		1104
Pro	Glu	Asp	Leu	Thr	Gly	Thr	Ile	Leu	Ile	Ala	Asp	Ser	Val	Arg	His		
		355					360					365					
gtc	gag	gaa	gcc	cac	gcc	ctc	att	gcc	ttg	ggg	caa	att	ccc	gat	gct		1152
Val	Glu	Glu	Ala	His	Ala	Leu	Ile	Ala	Leu	Gly	Gln	Ile	Pro	Asp	Ala		
	370					375					380						
aat	cgg	tct	tta	tat	ttg	gat	att	ccc	act	gta	ttg	gac	ccc	acc	atg		1200
Asn	Pro	Ser	Leu	Tyr	Leu	Asp	Ile	Pro	Thr	Val	Leu	Asp	Pro	Thr	Met		
385					390					395					400		
gcc	ccc	cct	ggg	cag	cac	acc	ctc	tgg	atc	gaa	ttt	ttt	gcc	ccc	tac		1248
Ala	Pro	Pro	Gly	Gln	His	Thr	Leu	Trp	Ile	Glu	Phe	Phe	Ala	Pro	Tyr		
				405					410					415			
cgc	atc	gcc	ggg	ttg	gaa	ggg	aca	ggg	tta	atg	ggc	aca	ggt	tgg	acc		1296
Arg	Ile	Ala	Gly	Leu	Glu	Gly	Thr	Gly	Leu	Met	Gly	Thr	Gly	Trp	Thr		

420

425

430

gat gag tta aag gaa aaa gtg gcg gat cgg gtg att gat aaa tta acg 1344
 Asp Glu Leu Lys Glu Lys Val Ala Asp Arg Val Ile Asp Lys Leu Thr
 435 440 445

gac tat gcc cct aac cta aaa tct ctg atc att ggt cgc cga gtg gaa 1392
 Asp Tyr Ala Pro Asn Leu Lys Ser Leu Ile Ile Gly Arg Arg Val Glu
 450 455 460

agt ccc gcc gaa ctg gcc caa cgg ctg gga agt tac aac ggc aat gtc 1440
 Ser Pro Ala Glu Leu Ala Gln Arg Leu Gly Ser Tyr Asn Gly Asn Val
 465 470 475 480

tat cat ctg gat atg agt ttg gac caa atg atg ttc ctc cgg cct cta 1488
 Tyr His Leu Asp Met Ser Leu Asp Gln Met Met Phe Leu Arg Pro Leu
 485 490 495

ccg gaa att gcc aac tac caa acc ccc atc aaa aat ctt tac tta aca 1536
 Pro Glu Ile Ala Asn Tyr Gln Thr Pro Ile Lys Asn Leu Tyr Leu Thr
 500 505 510

ggg gcg ggt acc cat ccc ggt ggc tcc ata tca ggt atg ccc ggt aga 1584
 Gly Ala Gly Thr His Pro Gly Gly Ser Ile Ser Gly Met Pro Gly Arg
 515 520 525

aat tgc gct cgg gtc ttt tta aaa caa caa cgt cgt ttt tgg taa 1629
 Asn Cys Ala Arg Val Phe Leu Lys Gln Gln Arg Arg Phe Trp
 530 535 540

<210> 12

<211> 542

<212> PRT

<213> Synechococcus sp.

<400> 12

Met Ile Thr Thr Asp Val Val Ile Ile Gly Ala Gly His Asn Gly Leu
 1 5 10 15

Val Cys Ala Ala Tyr Leu Leu Gln Arg Gly Leu Gly Val Thr Leu Leu
 20 25 30

Glu Lys Arg Glu Val Pro Gly Gly Ala Ala Thr Thr Glu Ala Leu Met
 35 40 45

Pro Glu Leu Ser Pro Gln Phe Arg Phe Asn Arg Cys Ala Ile Asp His
 50 55 60

Glu Phe Ile Phe Leu Gly Pro Val Leu Gln Glu Leu Asn Leu Ala Gln
 65 70 75 80

Tyr Gly Leu Glu Tyr Leu Phe Cys Asp Pro Ser Val Phe Cys Gly
 85 90 95

Leu Asp Gly Gln Ala Phe Met Ser Tyr Arg Ser Leu Glu Lys Thr Cys
 100 105 110

Ala His Ile Ala Thr Tyr Ser Pro Arg Asp Ala Glu Lys Tyr Arg Gln
 115 120 125

Phe Val Asn Tyr Trp Thr Asp Leu Leu Asn Ala Val Gln Pro Ala Phe
 130 135 140

Asn Ala Pro Pro Gln Ala Leu Leu Asp Leu Ala Leu Asn Tyr Gly Trp
 145 150 155 160

Glu Asn Leu Lys Ser Val Leu Ala Ile Ala Gly Ser Lys Thr Lys Ala
 165 170 175

Leu Asp Phe Ile Arg Thr Met Ile Gly Ser Pro Glu Asp Val Leu Asn
 180 185 190

Glu Trp Phe Asp Ser Glu Arg Val Lys Ala Pro Leu Ala Arg Leu Cys
 195 200 205

Ser Glu Ile Gly Ala Pro Pro Ser Gln Lys Gly Ser Ser Ser Gly Met
 210 215 220

Met Met Val Ala Met Arg His Leu Glu Gly Ile Ala Arg Pro Lys Gly
 225 230 235 240

Gly Thr Gly Ala Leu Thr Glu Ala Leu Val Lys Leu Val Gln Ala Gln
 245 250 255

Gly Gly Lys Ile Leu Thr Asp Gln Thr Val Lys Arg Val Leu Val Glu
 260 265 270

Asn Asn Gln Ala Ile Gly Val Glu Val Ala Asn Gly Glu Gln Tyr Arg
 275 280 285

Ala Lys Lys Gly Val Ile Ser Asn Ile Asp Ala Arg Arg Leu Phe Leu
 290 295 300

Gln Leu Val Glu Pro Gly Ala Leu Ala Lys Val Asn Gln Asn Leu Gly
 305 310 315 320

Glu Arg Leu Glu Arg Arg Thr Val Asn Asn Asn Glu Ala Ile Leu Lys
 325 330 335

Ile Asp Cys Ala Leu Ser Gly Leu Pro His Phe Thr Ala Met Ala Gly
 340 345 350

Pro Glu Asp Leu Thr Gly Thr Ile Leu Ile Ala Asp Ser Val Arg His
 355 360 365

Val Glu Glu Ala His Ala Leu Ile Ala Leu Gly Gln Ile Pro Asp Ala
 370 375 380

Asn Pro Ser Leu Tyr Leu Asp Ile Pro Thr Val Leu Asp Pro Thr Met
 385 390 395 400

Ala Pro Pro Gly Gln His Thr Leu Trp Ile Glu Phe Phe Ala Pro Tyr
 405 410 415

Arg Ile Ala Gly Leu Glu Gly Thr Gly Leu Met Gly Thr Gly Trp Thr
 420 425 430

Asp Glu Leu Lys Glu Lys Val Ala Asp Arg Val Ile Asp Lys Leu Thr
 435 440 445

Asp Tyr Ala Pro Asn Leu Lys Ser Leu Ile Ile Gly Arg Arg Val Glu
 450 455 460

Ser Pro Ala Glu Leu Ala Gln Arg Leu Gly Ser Tyr Asn Gly Asn Val
 465 470 475 480

Tyr His Leu Asp Met Ser Leu Asp Gln Met Met Phe Leu Arg Pro Leu
 485 490 495

Pro Glu Ile Ala Asn Tyr Gln Thr Pro Ile Lys Asn Leu Tyr Leu Thr
 500 505 510

Gly Ala Gly Thr His Pro Gly Gly Ser Ile Ser Gly Met Pro Gly Arg
 515 520 525

Asn Cys Ala Arg Val Phe Leu Lys Gln Gln Arg Arg Phe Trp

530

535

540

<210> 13
 <211> 776
 <212> DNA
 <213> Bradyrhizobium sp.

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(774)
 <223>

<400> 13
 atg cat gca gca acc gcc aag gct act gag ttc ggg gcc tct cgg cgc 48
 Met His Ala Ala Thr Ala Lys Ala Thr Glu Phe Gly Ala Ser Arg Arg
 1 5 10 15
 gac gat gcg agg cag cgc cgc gtc ggt ctc acg ctg gcc gcg gtc atc 96
 Asp Asp Ala Arg Gln Arg Arg Val Gly Leu Thr Leu Ala Ala Val Ile
 20 25 30
 atc gcc gcc tgg ctg gtg ctg cat gtc ggt ctg atg ttc ttc tgg ccg 144
 Ile Ala Ala Trp Leu Val Leu His Val Gly Leu Met Phe Phe Trp Pro
 35 40 45
 ctg acc ctt cac agc ctg ctg ccg gct ttg cct ctg gtg gtg ctg cag 192
 Leu Thr Leu His Ser Leu Leu Pro Ala Leu Pro Leu Val Val Leu Gln
 50 55 60
 acc tgg ctc tat gta ggc ctg ttc atc atc gcg cat gac tgc atg cac 240
 Thr Trp Leu Tyr Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala His Asp Cys Met His
 65 70 75 80
 ggc tcg ctg gtg ccg ttc aag ccg cag gtc aac cgc cgt atc gga cag 288
 Gly Ser Leu Val Pro Phe Lys Pro Gln Val Asn Arg Arg Ile Gly Gln
 85 90 95
 ctc tgc ctg ttc ctc tat gcc ggg ttc tcc ttc gac gct ctc aat gtc 336
 Leu Cys Leu Phe Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Phe Asp Ala Leu Asn Val
 100 105 110
 gag cac cac aag cat cac cgc cat ccc ggc acg gcc gag gat ccc gat 384
 Glu His His Lys His His Arg His Pro Gly Thr Ala Glu Asp Pro Asp
 115 120 125
 ttc gac gag gtg ccg ccg cac ggc ttc tgg cac tgg ttc gcc agc ttt 432
 Phe Asp Glu Val Pro Pro His Gly Phe Trp His Trp Phe Ala Ser Phe
 130 135 140
 ttc ctg cac tat ttc ggc tgg aag cag gtc gcg atc atc gca gcc gtc 480
 Phe Leu His Tyr Phe Gly Trp Lys Gln Val Ala Ile Ile Ala Ala Val
 145 150 155 160
 tcg ctg gtt tat cag ctc gtc ttc gcc gtt ccc ttg cag aac atc ctg 528
 Ser Leu Val Tyr Gln Leu Val Phe Ala Val Pro Leu Gln Asn Ile Leu

165

170

ctg ttc tgg gcg ctg ccc ggg ctg ctg tcg gcg ctg cag ctg ttc acc 576
 Leu Phe Trp Ala Leu Pro Gly Leu Leu Ser Ala Leu Gln Leu Phe Thr
 180 185 190
 ttc ggc acc tat ctg ccg cac aag ccg gcc acg cag ccc ttc gcc gat 624
 Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Ala Thr Gln Pro Phe Ala Asp
 195 200 205
 cgc cac aac gcg cgg acg agc gaa ttt ccc gcg tgg ctg tcg ctg ctg 672
 Arg His Asn Ala Arg Thr Ser Glu Phe Pro Ala Trp Leu Ser Leu Leu
 210 215 220
 acc tgc ttc cac ttc ggc ttt cat cac gag cat cat ctg cat ccc gat 720
 Thr Cys Phe His Phe Gly Phe His His Glu His His Leu His Pro Asp
 225 230 235 240
 gcg ccg tgg tgg cgg ctg ccg gag atc aag cgg cgg gcc ctg gaa agg 768
 Ala Pro Trp Trp Arg Leu Pro Glu Ile Lys Arg Arg Ala Leu Glu Arg
 245 250 255
 cgt gac ta 776
 Arg Asp

<210> 14
 <211> 258
 <212> PRT
 <213> Bradyrhizobium sp.

<400> 14

Met His Ala Ala Thr Ala Lys Ala Thr Glu Phe Gly Ala Ser Arg Arg
 1 5 10 15
 Asp Asp Ala Arg Gln Arg Arg Val Gly Leu Thr Leu Ala Ala Val Ile
 20 25 30
 Ile Ala Ala Trp Leu Val Leu His Val Gly Leu Met Phe Phe Trp Pro
 35 40 45
 Leu Thr Leu His Ser Leu Leu Pro Ala Leu Pro Leu Val Val Leu Gln
 50 55 60
 Thr Trp Leu Tyr Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala His Asp Cys Met His
 65 70 75 80
 Gly Ser Leu Val Pro Phe Lys Pro Gln Val Asn Arg Arg Ile Gly Gln
 85 90 95

DE 102 38 978 A1 2004.03.04

Leu Cys Leu Phe Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Phe Asp Ala Leu Asn Val
100 105 110

Glu His His Lys His His Arg His Pro Gly Thr Ala Glu Asp Pro Asp
115 120 125

Phe Asp Glu Val Pro Pro His Gly Phe Trp His Trp Phe Ala Ser Phe
130 135 140

Phe Leu His Tyr Phe Gly Trp Lys Gln Val Ala Ile Ile Ala Ala Val
145 150 155 160

Ser Leu Val Tyr Gln Leu Val Phe Ala Val Pro Leu Gln Asn Ile Leu
165 170 175

Leu Phe Trp Ala Leu Pro Gly Leu Leu Ser Ala Leu Gln Leu Phe Thr
180 185 190

Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Ala Thr Gln Pro Phe Ala Asp
195 200 205

Arg His Asn Ala Arg Thr Ser Glu Phe Pro Ala Trp Leu Ser Leu Leu
210 215 220

Thr Cys Phe His Phe Gly Phe His His Glu His His Leu His Pro Asp
225 230 235 240

Ala Pro Trp Trp Arg Leu Pro Glu Ile Lys Arg Arg Ala Leu Glu Arg
245 250 255

Arg Asp

<210> 15
<211> 777
<212> DNA
<213> Nostoc sp.

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(777)
<223>

<400> 15

DE 102 38 978 A1 2004.03.04

atg gtt cag tgt caa cca tca tct ctg cat tca gaa aaa ctg gtg tta	48
Met Val Gln Cys Gln Pro Ser Ser Leu His Ser Glu Lys Leu Val Leu	
1 5 10 15	
ttg tca tgc aca atc aga gat gat aaa aat att aat aag ggt ata ttt	96
Leu Ser Ser Thr Ile Arg Asp Asp Lys Asn Ile Asn Lys Gly Ile Phe	
20 25 30	
att gcc tgc ttt atc tta ttt tta tgg gca att agt tta atc tta tta	144
Ile Ala Cys Phe Ile Leu Phe Leu Trp Ala Ile Ser Leu Ile Leu Leu	
35 40 45	
ctc tca ata gat aca tcc ata att cat aag agc tta tta ggt ata gcc	192
Leu Ser Ile Asp Thr Ser Ile Ile His Lys Ser Leu Leu Gly Ile Ala	
50 55 60	
atg ctt tgg cag acc ttc tta tat aca ggt tta ttt att act gct cat	240
Met Leu Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His	
65 70 75 80	
gat gcc atg cac ggc gta gtt tat ccc aaa aat ccc aga ata aat aat	288
Asp Ala Met His Gly Val Val Tyr Pro Lys Asn Pro Arg Ile Asn Asn	
85 90 95	
ttt ata ggt aag ctc act cta atc ttg tat gga cta ctc cct tat aaa	336
Phe Ile Gly Lys Leu Thr Leu Ile Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Lys	
100 105 110	
gat tta ttg aaa aaa cat tgg tta cac cac gga cat cct ggt act gat	384
Asp Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His Gly His Pro Gly Thr Asp	
115 120 125	
tta gac cct gat tat tac aat ggt cat ccc caa aac ttc ttt ctt tgg	432
Leu Asp Pro Asp Tyr Tyr Asn Gly His Pro Gln Asn Phe Phe Leu Trp	
130 135 140	
tat cta cat ttt atg aag tct tat tgg cga tgg acg caa att ttc gga	480
Tyr Leu His Phe Met Lys Ser Tyr Trp Arg Trp Thr Gln Ile Phe Gly	
145 150 155 160	
tta gtg atg att ttt cat gga ctt aaa aat ctg gtg cat ata cca gaa	528
Leu Val Met Ile Phe His Gly Leu Lys Asn Leu Val His Ile Pro Glu	
165 170 175	
aat aat tta att ata ttt tgg atg ata cct tct att tta agt tca gta	576
Asn Asn Leu Ile Ile Phe Trp Met Ile Pro Ser Ile Leu Ser Ser Val	
180 185 190	
caa cta ttt tat ttt ggt aca ttt ttg cct cat aaa aag cta gaa ggt	624
Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Lys Lys Leu Glu Gly	
195 200 205	
ggg tat act aac ccc cat tgt gcg cgc agt atc cca tta cct ctt ttt	672
Gly Tyr Thr Asn Pro His Cys Ala Arg Ser Ile Pro Leu Pro Leu Phe	
210 215 220	
tgg tct ttt gtt act tgt tat cac ttc ggc tac cac aag gaa cat cac	720

Trp Ser Phe Val Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Lys Glu His His
 225 230 235 240

gaa tac cct caa ctt cct tgg tgg aaa tta cct gaa gct cac aaa ata
 Glu Tyr Pro Gln Leu Pro Trp Trp Lys Leu Pro Glu Ala His Lys Ile
 245 250 255

768

tct tta taa
 Ser Leu

777

<210> 16
 <211> 258
 <212> PRT
 <213> Nostoc sp.

<400> 16

Met Val Gln Cys Gln Pro Ser Ser Leu His Ser Glu Lys Leu Val Leu
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Thr Ile Arg Asp Asp Lys Asn Ile Asn Lys Gly Ile Phe
 20 25 30

Ile Ala Cys Phe Ile Leu Phe Leu Trp Ala Ile Ser Leu Ile Leu Leu
 35 40 45

Leu Ser Ile Asp Thr Ser Ile Ile His Lys Ser Leu Leu Gly Ile Ala
 50 55 60

Met Leu Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His
 65 70 75 80

Asp Ala Met His Gly Val Val Tyr Pro Lys Asn Pro Arg Ile Asn Asn
 85 90 95

Phe Ile Gly Lys Leu Thr Leu Ile Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Lys
 100 105 110

Asp Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His Gly His Pro Gly Thr Asp
 115 120 125

Leu Asp Pro Asp Tyr Tyr Asn Gly His Pro Gln Asn Phe Phe Leu Trp
 130 135 140

Tyr Leu His Phe Met Lys Ser Tyr Trp Arg Trp Thr Gln Ile Phe Gly
 145 150 155 160

DE 102 38 978 A1 2004.03.04

Leu Val Met Ile Phe His Gly Leu Lys Asn Leu Val His Ile Pro Glu
165 170 175

Asn Asn Leu Ile Ile Phe Trp Met Ile Pro Ser Ile Leu Ser Ser Val
180 185 190

Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Lys Lys Leu Glu Gly
195 200 205

Gly Tyr Thr Asn Pro His Cys Ala Arg Ser Ile Pro Leu Pro Leu Phe
210 215 220

Trp Ser Phe Val Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Lys Glu His His
225 230 235 240

Glu Tyr Pro Gln Leu Pro Trp Trp Lys Leu Pro Glu Ala His Lys Ile
245 250 255

Ser Leu

<210> 17
<211> 2093
<212> DNA
<213> Tomato

<220>
<221> promoter
<222> (1)..(2093)
<223>

<400> 17
tttgccagta ttacaacagc ttatatgttg agcaggttaa agcttcaatg cctatttctt 60
tctacagtta tcaatgttgc tcgtctaata tctggtgttc ttctcgaaat gtcaattggc 120
ttgcagcaca ttgtcctcta atatccattc aagcttctta gatgatgaaa catttgtaa 180
atattattaat tcatagtggt tcagttctca ttctttagct ggttctctcat agtaaagtgt 240
tctaatatga aatgaaaatg ttctgtgtgt tgtactaata ctttttcatg gttgtctata 300
gaacgtcgat gaagagccaa acagaaacta ttttgggctg cgattttctga taccattgta 360
tctgaatgct ggggtgggagc tcatcagaag ctttacaatg ggtcacatat atggagccgg 420
tatgaggaat gctgggaatc agttgcgttt cgcgtgctag gacttttctt tcttgggtatt 480

tctgcccaca gcccagttga ttacgtgaac tccgtcagac ttggaaagga gagaagtacc	540
caaatgtcgt ctttttagaa atacttttgt cacaaaatag cgggggtttac agctacagaa	600
gatcatgcag aaggcgteca gtttagtttt tgaaggttgt ttggagttta tttatctaaa	660
gtaaacttaa atcagctttt tgtttatgag ttcagtgaac tatatgttca aataagactt	720
ccctttgtag atatgtgttt tttttgttgt tgagcacttt gtgtgcattg gataaacccc	780
caacgtgtaa tagctaccat acaagagaag taactcgac tgcccatgtc ttatgtggct	840
cgactcagaa agcattcagg gggattgata accaccctcc aaaccaactg aaccattgtg	900
aataaccacc ctccaaatca accgagtcct cgtgaaggac aaatatgtgg ttttatatac	960
attaaatttt gtttttacat gcttcctctt acttcttttag tttcttgac catatcttgc	1020
gtttttccct tctgtaattg acacttttct tcaaaccatc cagcaatgtg gaagcttgac	1080
gattttcctt cagagtagaa attgaaaaga atcaactaaa aaggatagtc cttcgatttg	1140
atttccggct taaaaataaa ctaataagaa tgagagagcg aataatagaa tattttgaaa	1200
ttttaaagat attcaactat gttaaattgc gttataaatt tcttaaatta gtagcaccta	1260
atagtttagt tctcaaaagt caaaactact acataatgtg ctcatTTTTT acattaaaat	1320
gcctacatga tgtaaaagta aaactcgtag cattctacgt gttttactca actcaaacat	1380
cctgttcatt ttaataaacg tacgatgagc ttctctctcc aattttcttt tctttttttt	1440
ttttaaaaaa atattttttt ttatatcaat ccaaattggc tccaatttat cataaattag	1500
gtagaaactt agatattaaa gaaagaaaag ggtttatctc gcaagtgtgg ctatgggtggg	1560
acgtgtcaaa ttttggattg tagccaaaca tgagatttga tttaaagggg attggccaaa	1620
tcaccgaaag caggcatctt catcataaat tagtttgttt atttatacag aattatacgc	1680
ttttactagt tatagcatte ggtatctttt tctgggtaac tgccaaacca ccacaaattt	1740
caagtttcca ttttaactctt caacttcaac ccaaccaaat ttatttgctt aattgtgcag	1800
aaccactccc tatatcttct aggtgcttct attcgttccg aggttaagaaa agatttttgt	1860
ttctttgaat gctttatgcc actcgtttaa cttctgaggt ttgtggatct tttaggcgac	1920
tttttttttt tttgtatgta aaatttgttt cataaatgct tctcaacata aatcttgaca	1980
aagagaagga attttaccaa gtatttaggt tcagaaatgg ataattttct tactgtgaaa	2040
tatccttatg gcagggttta ctgttatttt tcagtaaaat gcctcaaatt gga	2093

<210> 18

DE 102 38 978 A1 2004.03.04

<211> 4760
 <212> DNA
 <213> Tomato

<220>
 <221> promoter
 <222> (1)..(4760)
 <223>

<400> 18
 tctagattga aataaacctt attgcattta gtatatgaga atgcatctat aaaataatgt 60
 ctatTTTTTgg tggaaaatat ttgtgcgcca aagcacgggt tgtatTTTat attttacaat 120
 atttttgcac ggtaatatag ttgcaagggt ttacaaacga attatctctt gaactTTaaa 180
 ttaagttcac agttttattcc aaaaataatg ttcaacttct aatcatatct cccctattg 240
 ctagaaaaat ataacattta cgcccaactt catttaggat ccattTTTat gcatgggtga 300
 gcaattggat catatactac atattTTTTT aaaaaaata gatagaaatt atttaatctt 360
 gattccgaat caattgtgat gggaaaacct tattagtttg atgtgtacat ataatgtttt 420
 atgtcaaata aattttatttt atactaaatt ttatttgaaa gtattTTTct cataacaaat 480
 aatttaacta tattggagac atgaaaattc taaaaaacca acttgcatta tcaacataat 540
 tttatagttt gaaattgtgc tcttaattaa acaattcaag ataacaatct ggtaaaatta 600
 aaattacaag ttgataacaa acatatacat atgtacatct catagatgca ttcattaaat 660
 catataatag taaatgcttc acaatagaag ggtctatatt cattTTTTTt ttatgtgtca 720
 aacaattttg aggaattcaa tttcatcttt aactgggtaca ataatcattt tatcatgaaa 780
 ataagcagct caagagaatt tttgaagaat cttttatttc tttaacattt aaccacatga 840
 atttttaatt tttttttgca atacatttaa accgaaatgg tcaaacgatc aaccaactga 900
 tctttattct aataaacttc tagtttacat ttgcatgtga gtgcatcacc attatcatat 960
 ttgtacacaa caaacaagaa aaaaatataa acaatatttt atttaaatat ttatattcca 1020
 ctttgactgt agatattaaa tcttgtcacc atttatagtc tcaatattat aattTTTTta 1080
 ttttttcaa attcaaaagt ttacaattat ttttttgaac tataatatta tccaagatga 1140
 acatctcaag aagaaaatta ttaatatgtt tatgggttaa attttacata caatacttgt 1200
 tttttgcttt acttttatct taccgtagat acacaatcga cgataactta gtgatcacac 1260
 aataataatt attttgttca tgacacaata ttataagaa atacttattt ctttctttta 1320
 tccttcagta gttcataata aaacataacc ataatatTTg tgatgcattc atagtacgta 1380

atgaaatgac aatttatgtc aaattatttt cttttatact ctcaaacctc ccgtaaagggt	1440
gagatgagtc atttatccaa ttatacataa atatgtcttt attcatgctc tttatcacat	1500
tctgacacat tcacttaatt tcaagagtaa gcaagcatga taactgasac tatttatgctg	1560
tatctttacct tgatatttga cacattacat gacacacctc aacatcactt tcaaagatta	1620
agcgcaccac catattatct ttcttttttt ttttatgaag gttttataaa attattaaat	1680
taggtccaaa aaattgtttg tcaaataacc ttttatacta gattgatgac aaaaattacc	1740
tttacgtttt gaaagaccat ttttaagacct aatctatcag tgactcctta aagttggcac	1800
aatatttcac ttagacaccc taattgaatg atgttcattt taaacacca atgtagggtt	1860
ccgctatctc attttgacac atttcttaac atcaacaaaa atatataatg agtatgtgat	1920
atactcgcga atgacgtgaa aaatgaagac atttgttatt tgtatcaag tagttactaa	1980
ataattaatt ttgaataaaa ataaaagctg accagtaaat caataacaca taatattttc	2040
cacctataaa ttaaaatata aaataaaaaa gagccatctc agggctatct gccaccatt	2100
gctatttcaa agaaatttgt acgttagttt atagaaattg atgttaaaat tctttcaaga	2160
aaaatttatg aatgaattta ttctctaatt taaaaatatt ttctgttatt tttgttgaaa	2220
gaaatttaac ttggataaaa tgggtggtta aactggaaag aagaaaagag aaaaaataat	2280
taaaaatcat ttcacgctct aatcaatgag cgtatcacat tcattatgtt atataagcaa	2340
aagtgcacaa acgaaaataa tatattacat gaaatgtcta aaataaatat cgtctaatta	2400
aaatatctaa gtaacatatt gtgcctaact ttagagggat catcaataag ttaaacccca	2460
ttttaataac tcataattgt cctttttatt taatattgtc acaaatcaca atgataatta	2520
acattaattt gtcttttgtg acgtccatat tcatgcattt aaccaatcat cttcatttgg	2580
acttattatc acaattatcc cactttctc acaaaatgga gcattcaagt ggaatagact	2640
acacgatttt taatttcac aaaaacatct ttttgcttta ttcattatta tattgtcgct	2700
attgttgaat ttattttgcc cttaaattct taccataaat agatttttct tttagaaaaa	2760
ggagattgac taattctttt ctgttaggaa aagggttagg actctataaa tagagacata	2820
ttctttctaa cttaatcaac atttacaatg tagtcttaaa gactttgaaa gtttttggtt	2880
agggggagaa attgtgggtc acaagcttga tacgttatca attgtgtaaa cctcccatgt	2940
attctgagtg aatttggttg aggttggttc cctctgtatt ttgtactctc atatttatag	3000
tggattcttc atctctttcg tggacgtagg tcgattgacc gtcgattgac cgaaccacgt	3060
taaatctttg tattttttga tatatttctc attatcttct tactcgtgat ctttcaagggt	3120

DE 102 38 978 A1 2004.03.04

ttgcattgct atcttccgcg ttacaccaac ttatttacga tccaaacagc tatgggtgtgg	3180
aaacataaat caaacatttt actgatataa acacatcttt gattataaca tgatagaaat	3240
ttgagcccaa ctttttatca tcattatata caaaaagttc taaatttttt ttttgatgta	3300
gtaaaactta aatccatagt cttgccccta aaccaatgac ataatatata acccaaaata	3360
tactagtttt cgcctcgag ccctttaaaa agtatagtca atatttacgg tgaccgtgaa	3420
tttcttaatt atgatataata atttaaaaga aatcatgac acatttctact gatgagaaca	3480
tgtgctaatac aagggaaaac atggatgtga aaaatacttt ttgttaaaag taaaaaaaaa	3540
tgtgaaattt tgttagttat ttactaccta tacattattt gagcatgtgc aaactttaca	3600
aatacctaatac agaagatttt cacctgctg tatatatgta aattaattat aatgaacact	3660
ctcacataaa ataattatca gtatatacat taatacttgc cctccacaat gaattaaata	3720
aatgtagaa catgatctac acttcaataa aactaagacc ataaagaata atttcaaaat	3780
atacacatgt caacaataaa ttatttgcac attatattaa ctactaaac aatctttact	3840
tttgaaatat aaaaataatc aagttataag tctgtcaca gtaaagcact tgttagactc	3900
atctgatttt gagaaggtaa gcaaattgat ggtgcataat agtcacaagt aaaatataaa	3960
atagatttca ttagtaaaat tgttttttac tttctttata tataattatc aatattcttc	4020
aatggtaggt taattatatt gttaacttct tgttgaatta aagcaataag acaagaatat	4080
taaagataaa agaacaataa aatagaaag actaagagat aagagttttc ttattcttct	4140
ttcaataagt atcatcaagt gtatacaata taaatttttg tatttttgat ctatctattt	4200
ataatgttat atataagcat acaaaagatc agtcataaat atgactttaa tcatgaaaat	4260
aatgaaagag attatgaagg cgtaagggtta ctagaataat agtcattaaa aaaaggggtt	4320
atctttataa ttgaataatt gatgaagtaa tggagataat tagtgagcat aaattttttt	4380
aaaaaatgg acattttacac tataatattt tataaacactt tcccttaaac atctaggtat	4440
aaataatgag tcttgtcaaa atcttagtag gaaaaattct gtgaaatttt tttagtga	4500
acaaatgata taaatatctt gaatactcat tatttgttgc ctcatataaa atcttatctg	4560
acctataaaa taaattattt gctcaactca aaatagtttt tcattctaaa attagtataa	4620
ttattagtga atatttaatt aacataattg tataactaagg ggcctataaa ttggattctt	4680
ctcaagaaa aataaaatca ccacacaact ttcttcttct gctcatcaat tagcaattaa	4740
tccaaaacca ttatggctgc	4760

<210> 19
 <211> 1229
 <212> DNA
 <213> Tomato

<220>
 <221> promoter
 <222> (1)..(1229)
 <223>

<400> 19
 gatcttactt taccataatg gtgaaaagga tagagaccca catgggtttt acttcgttat 60
 agagacaaga tgaaaacaaa tctaaaattt aatattatag atggatagat gatggacaac 120
 aaaaagagaa aagaagatac tggtcattgg tccaaaacag ccacccgaat caatatatga 180
 ccgaaaaaca aaagctacag aatcatactt gtgcaacggt gccacagtgc tataggatag 240
 cacaaccaca ctgtcacata aaaaagagga ttttgcactc gttttagatg gagtttcgta 300
 attttcgggt ctttcaagct taaatatata cttcattaaa gcttcgaatt ttgtaatggt 360
 caattctacc tctttgatgt tcgataccta taaaataatt aaataaacgt atagacgtag 420
 gaacaattaa ggggagtttag atagtgcatt tatgattcta cctgtgagtg caatggtaaa 480
 atggacatta taaaagagta ggggcaaaga ggggaagtga aaattctccc cacttagcca 540
 tgtttaatat agtagggata ggaatatgta ataagtagtg ttttttctat ttaattttct 600
 gtatacttct tccatctect ttaattatta aaagggtttc ctctctttac tctttctctc 660
 taaattacta ttctgaagta tattttcttt tataaaaaga gtaataaact ttatttccat 720
 taaaagaaca aacaacaaga aatgataatc aaatacacat tcatattttt aaaaaaaaag 780
 ttaaacaaga tatagaaata gttatcaaat atatttatgt tgtcattcct tgtatacaat 840
 ggcatctcct tagctttgtt tatgtatttc ctgagcttct cttagtgtac tatatccttt 900
 aatattaatg catctttcga tcttgctaag atatgataaa aatagacgac acgtgtcaca 960
 acctaatga gatatttcga tgtactttct atccgtctta gotttgaatt aattattggt 1020
 aaaaaagaat actcaattaa ctagaacaa gaaataagaa acgaaaacat tacaaaacgg 1080
 agttgaagcg tgcaaatgtg tggaaatgat tgttatcatg aaccagaaaa cattaaataa 1140
 ctcttcctat aaaaggccct tattcttcac tttctcaaat cacgtcctaa agatatcaaa 1200
 gatttcaact gatagcaaaa agcactact 1229

<210> 20

<211> 845
 <212> DNA
 <213> Tomato

<220>
 <221> promoter
 <222> (1)..(845)
 <223>

<400> 20
 ctgttattga atttctataa aatgttataa tattgatttc ttaatgatca gttaactacg 60
 tgattatttg atatgttttt aatctaaaat gtgatatgta aaatatagaa gaaaaaaaaat 120
 taaaaagaac ttttaagaaaa aaatttcaac ccaccccaac ctaaaatcct aggtccgcca 180
 tggtaattat agatatatga tgatgaaggg caaatattgg tctatgagaa tttcgggtgat 240
 actaccgctt gaagagcaat aatggttttg ggactccgat gagggaaaca ttcaaatatg 300
 atggattttg gtgatactat gtttaccga gctagctatc acagaataat ctacatccca 360
 caaatgaaat atgttatagg ctaccaatta ggaagtagtg gaattatgaa gaagtaggga 420
 tgtgcaaata taagagaaaa tttgaaaatt atgattgaaa caagttatgt ttttttaact 480
 agatgaatta aatggtttaa agattttag atttataatc aaacaattac cgctactcta 540
 tcggtgacta ccaattccat cattgtaaat aacaaataac agattcgttg ctggatgtct 600
 tagtgccgtg aagcctacaa atcacactat aaactgctta gctctcgagc gttactaatt 660
 tgggtgattac caattccaac attgcgactt cttctactag tagtactaaa atagcaagta 720
 atatgcattt gtggtaagat gtttggtgtt aacctttcct aaccagacta taaatgacct 780
 caacactata gtggagtttc atcgatcatc attctaaacg aaaaacttga agtgaaagca 840
 tcaag 845

<210> 21
 <211> 3417
 <212> DNA
 <213> Tomato

<220>
 <221> promoter
 <222> (1)..(3417)
 <223>

<400> 21
 aagcttggct gcaggtcgac ctgcaggta acggatcaat gccttggtta taatatgaaa 60
 ataagacgta aaagaagtct tgcatatgca ccataatatt agacttatgg acaaaagtaa 120

gttggttcaa attacc ttttatcca catagcaaga aaataata aaaaatccaa 180
 cggatcgggt tattttatat ttactctac atgtatatat gtagtataat ggacataaat 240
 tctgtcgtaa ttatacatat attaataatg aggattgtaa aataatatgc aaaaacgtcg 300
 tatttgacat actaatagct aaaatactac ctactatcat atataattag ttaactatgt 360
 gcctttttaag aaaaattacg tgaaataaca aatatttaga gcatattatg taatatagct 420
 gtagttttat tattttttgt taatggctac aatttcgcaa aattttccta ttttgtttct 480
 taatcgtata aatccaaatt ttgtataatt atgaccttaa ttgtttaatt cagatttcgt 540
 ataaaattcg atttttgatt ttataaatta aaatttatac ttactttagc tacttgttta 600
 tgatttatca aaaaattcat attaatctat ttgtatatgg acaagcaaaa tatacaaatg 660
 gagttctgaa aattttctaaa tgcataact taatatcttt gatggtcact caactatcaa 720
 ctttttccat aaaaagtcac ttaacattga ttttcaactc gaaaatcact caactatgaa 780
 atctttgtat agaaagtcac tcaacctatt taattatttt tttccattat atctgttgtc 840
 acgaaatatt atttctaact aatattctaa gaataaacat acatccattt aaatcattta 900
 ataaacccgc ccacttgacc taaccacat aatattaaca cttttgtttt acttttattc 960
 tccaaaatta ttttcttggg ttccattct ttctccttg cttttttttt cttcttctca 1020
 atttcagcct ttttcttct ttttttagta aacctcagtc aaataggaat tagattgtga 1080
 ttaaaatatt attagaagga tgcagggttg taaaaagaga gtttattaag agataatcta 1140
 taaaaaaaaa aaagtcagat aatgcatatt cagattcaga gatcattaaa tgatgacttt 1200
 tttcgtaata ggttttcttt aaatcctttc gccttcatac gacgactctc gataataaca 1260
 tcgttttaag ctaataatgc taatgaacaa taatcaaat aaaaaagaat tcggatacaa 1320
 gagaanaatga tttagtgaaga gaaaaaattg agatattcct tattcctaac taaacgaagg 1380
 aagaagaggc taaaattgag attcagttaa aaaaaaaaaa caaagaaaaa cgcaatggag 1440
 atgagagaaa gtaattttga aaaataaaaa taaattaaga gggtaaatat tttattttta 1500
 gcgagttggg ttaagtgggt ccggtcatta aatggatata tgtttatctt ttaaaatttt 1560
 agttagaaat acaaatttca aatcaacaaa ttttaatgaa azaataatta aatagggtga 1620
 gtggctttct atgcaaagat ctcatagttg agtgattttt gagtagaaaa tcatagttaa 1680
 gtgagtttct gtgaaaaaaaa attgatagtt gagtgactat caaagatatt aactctagac 1740
 ttgtcatatt cgtatactta catacgaaat atacaaacct ctgcctccat gacaagcaaa 1800

aaactataac tatgtacaa tatttttcgaa atcatagcta taaagtc ttatatctaa 1860
 tatctttact atttttaaaa atttcacata attttaatac ataaataatt tacttttaac 1920
 taacgaaaaa ggacattttt atgtcacctg agagcccatc ggtagattca tcacattttt 1980
 tegtttcttg taataaactg tacacatata aggagaaatt aaattagaga ttatttttcc 2040
 attttgagga gattaataaaa tttaaatgt aacttaacat gtaaactgct ataaaggtaa 2100
 caaaacacgt aaactgctat aaaggtaatt ctatttaaaa gataaataaa tgcttaaaag 2160
 aagtgccaaa aaaacacaaa caaacaatg aaactaaacc tacttcaagg gaagttcttg 2220
 tagtataaaa ataaataaag tcaacttatt cacgacattt ctttttggtt ttcttttggc 2280
 tacgtattca tattttaagtc tgactaattt agattctcgc tatatataaa agattcaggg 2340
 gtggctcaac gcaattggag gcctagagca aaatttcaat tcgcgcccta atatattata 2400
 tactttatat acctattttat tcaaaattta ttttttttac actatttaga tggaaattat 2460
 tagtacttaa tattgttttt tcagttatta gttttaggta aaattttatt aatacaacat 2520
 tgaaaaacat cctttaagtg agacaattat tatatgtatt gttaacatag tgctataagt 2580
 aataagtaaa taaatattaa ataaaaata gagtaagaac catagaattt gacacaagaa 2640
 gtgatgact tggatatacct cattttaaca tgcttgact ttagtaatgc ttgaatctaa 2700
 aatttaaaaa gaaataaaaa agaatttgta atccactttt tccaacactt ttactgtta 2760
 attcttattt ttaacatagt acaaaaaata taaaatgga taaaataatt tattttataa 2820
 aagattatat atatattttt ttatcatata taactaattt ttctataaaa atttaaacac 2880
 ataatttaat tttaaaaaaa atttggggct ttggggccta agacaaaggc cttaaaggac 2940
 aaaacataga gccgcccctg aaaagatctc attcgaaaga aaatatgcat taccaatgat 3000
 ttttcgtacc cagagctcaa aatcaaaatt gtactgttat ttttttaaaa aatttcactt 3060
 cagactaaat ggaatttttt tctttgggta acctgtttga tcaatctttt ggaatcagtt 3120
 aattttgaaa aataaattaa tgagaaataa tttgtatttg tccagcttat ttaagaatta 3180
 tttttgagca acaatttata tttagtcacg cttttaagtg ttttttttaa aataaatta 3240
 aggtattatt tgaaaaaatt actttttaa aaattgaatt aaattctgtt actcttatta 3300
 tatactccta tataatttga ttgccaaaa tatcaaactt ttaatatattg aagttgatgt 3360
 gagggattac ttcttgatta aattgtacta caatgtaata ttatcaaatt aaagctt 3417

<210> 22
 <211> 1155

<212> DNA
 <213> Haematococcus pluvialis

<220>
 <221> CDS
 <222> (6)..(995)
 <223>

<400> 22
 gaagc atg cag cta gca gcg aca gta atg ttg gag cag ctt acc gga agc 50
 Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser
 1 5 10 15

gct gag gca ctc aag gag aag gag aag gag gtt gca ggc agc tct gac 98
 Ala Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp
 20 25 30

gtg ttg cgt aca tgg gcg acc cag tac tcg ctt ccg tca gag gag tca 146
 Val Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser
 35 40 45

gac gcg gcc cgc ccg gga ctg aag aat gcc tac aag cca cca cct tcc 194
 Asp Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser
 50 55 60

gac aca aag ggc atc aca atg gcg cta gct gtc atc ggc tcc tgg gcc 242
 Asp Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala
 65 70 75

gca gtg ttc ctc cac gcc att ttt caa atc aag ctt ccg acc tcc ttg 290
 Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu
 80 85 90 95

gac cag ctg cac tgg ctg ccc gtg tca gat gcc aca gct cag ctg gtt 338
 Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val
 100 105 110

agc ggc agc agc agc ctg ctg cac atc gtc gta gta ttc ttt gtc ctg 386
 Ser Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu
 115 120 125

gag ttc ctg tac aca ggc ctt ttt atc acc acg cat gat gct atg cat 434
 Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His
 130 135 140

ggc acc atc gcc atg aga aac agg cag ctt aat gac ttc ttg ggc aga 482
 Gly Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg
 145 150 155

gta tgc atc tcc ttg tac gcc tgg ttt gat tac aac atg ctg cac cgc 530
 Val Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg
 160 165 170 175

aag cat tgg gag cac cac aac cac act ggc gag gtg ggc aag gac cct 578
 Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro
 180 185 190

gac ttc cac agg aac cct ggc att gtg ccc tgg ttt c age ttc 626
 Asp Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe
 195 200 205
 atg tcc agc tac atg tcg atg tgg cag ttt gcg cgc ctc gca tgg tgg 674
 Met Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp
 210 215 220
 acg gtg gtc atg cag ctg ctg ggt gcg cca atg gcg aac ctg ctg gtg 722
 Thr Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val
 225 230 235
 ttc atg gcg gcc gcg ccc atc ctg tcc gcc ttc cgc ttg ttc tac ttt 770
 Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe
 240 245 250 255
 ggc acg tac atg ccc cac aag cct gag cct ggc gcc gcg tca ggc tct 818
 Gly Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser
 260 265 270
 tca cca gcc gtc atg aac tgg tgg aag tcg cgc act agc cag gcg tcc 866
 Ser Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser
 275 280 285
 gac ctg gtc agc ttt ctg acc tgc tac cac ttc gac ctg cac tgg gag 914
 Asp Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu
 290 295 300
 cac cac cgc tgg ccc ttt gcc ccc tgg tgg gag ctg ccc aac tgc cgc 962
 His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg
 305 310 315
 cgc ctg tct ggc cga ggt ctg gtt cct gcc tag ctggacacac tgcagtgggc 1015
 Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala
 320 325
 cctgctgcca gctgggcatg cagggttgtgg caggactggg tgaggtgaaa agctgcaggc 1075
 gctgctgccc gacacgctgc atgggctacc ctgtgtagct gccgccacta ggggaggggg 1135
 tttgtagctg tcgagcttgc 1155

<210> 23
 <211> 329
 <212> PRT
 <213> Haematococcus pluvialis

<400> 23

Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala
 1 5 10 15

Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val
 20 25 30

Leu Arg Thr Trp [REDACTED] Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu [REDACTED] Ser Asp
 35 40 45

Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp
 50 55 60

Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala
 65 70 75 80

Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp
 85 90 95

Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser
 100 105 110

Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu
 115 120 125

Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly
 130 135 140

Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val
 145 150 155 160

Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys
 165 170 175

His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp
 180 185 190

Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met
 195 200 205

Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr
 210 215 220

Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe
 225 230 235 240

Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly
 245 250 255

Thr Tyr Met Pro Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser
260 265 270

Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp
275 280 285

Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His
290 295 300

His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg
305 310 315 320

Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala
325

<210> 24
<211> 1111
<212> DNA
<213> Haematococcus pluvialis

<220>
<221> CDS
<222> (4)..(951)
<223>

<400> 24
tgc atg cta gag gca ctc aag gag aag gag aag gag gtt gca ggc agc 48
Met Leu Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser
1 5 10 15
tct gac gtg ttg cgt aca tgg gcg acc cag tac tcg ctt ccg tca gaa 96
Ser Asp Val Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu
20 25 30
gag tca gac gcg gcc cgc ccg gga ctg aag aat gcc tac aag cca cca 144
Glu Ser Asp Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro
35 40 45
cct tcc gac aca aag ggc atc aca atg gcg cta gct gtc atc ggc tcc 192
Pro Ser Asp Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser
50 55 60
tgg gcc gca gtg ttc ctc cac gcc att ttt caa atc aag ctt ccg acc 240
Trp Ala Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr
65 70 75
tcc ttg gac cag ctg cac tgg ctg ccc gtg tca gat gcc aca gct cag 288
Ser Leu Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln
80 85 90 95

ctg gtt agc ggc a agc agc ctg ctg cac atc gtc gta gtc ac ttt Leu Val Ser Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe 100 105 110	336
gtc ctg gag ttc ctg tac aca ggc ctt ttt atc acc acg cat gat gct Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala 115 120 125	384
atg cat ggc acc atc gcc atg aga aac agg cag ctt aat gac ttc ttg Met His Gly Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu 130 135 140	432
ggc aga gta tgc atc tcc ttg tac gcc tgg ttt gat tac aac atg ctg Gly Arg Val Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu 145 150 155	480
cac cgc aag cat tgg gag cac cac aac cac act ggc gag gtg ggc aag His Arg Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys 160 165 170 175	528
gac cct gac ttc cac agg gga aac cct ggc att gtg ccc tgg ttt gcc Asp Pro Asp Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala 180 185 190	576
agc ttc atg tcc agc tac atg tgc atg tgg cag ttt gcg cgc ctc gca Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala 195 200 205	624
tgg tgg acg gtg gtc atg cag ctg ctg ggt gcg cca atg gcg aac ctg Trp Trp Thr Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu 210 215 220	672
ctg gtg ttc atg gcg gcc gcg ccc atc ctg tcc gcc ttc cgc ttg ttc Leu Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe 225 230 235	720
tac ttt ggc acg tac atg ccc cac aag cct gag cct ggc gcc gcg tca Tyr Phe Gly Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser 240 245 250 255	768
ggc tct tca cca gcc gtc atg aac tgg tgg aag tgc cgc act agc cag Gly Ser Ser Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln 260 265 270	816
gcg tcc gac ctg gtc agc ttt ctg acc tgc tac cac ttc gac ctg cac Ala Ser Asp Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His 275 280 285	864
tgg gag cac cac cgc tgg ccc ttc gcc ccc tgg tgg gag ctg ccc aac Trp Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn 290 295 300	912
tgc cgc cgc ctg tct ggc cga ggt ctg gtt cct gcc tag ctggacacac Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala 305 310 315	961
tgccagtgggc cctgctgccca gctgggcatg caggttgtgg caggactggg tgagggtgaaa	1021

agctgcaggc gctg gccg gacacgttgc atgggctacc ctgtg cct gccgccacta 1081
 ggggagggggg tttgtagctg tcgagcttgc 1111

<210> 25
 <211> 315
 <212> PRT
 <213> Haematococcus pluvialis

<400> 25

Met Leu Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser
 1 5 10 15

Asp Val Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu
 20 25 30

Ser Asp Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro
 35 40 45

Ser Asp Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp
 50 55 60

Ala Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser
 65 70 75 80

Leu Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu
 85 90 95

Val Ser Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val
 100 105 110

Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met
 115 120 125

His Gly Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly
 130 135 140

Arg Val Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His
 145 150 155 160

Arg Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp
 165 170 175

Pro Asp Phe His Asn Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser
180 185 190

Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp
195 200 205

Trp Thr Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu
210 215 220

Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr
225 230 235 240

Phe Gly Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly
245 250 255

Ser Ser Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala
260 265 270

Ser Asp Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp
275 280 285

Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys
290 295 300

Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala
305 310 315

<210> 26
<211> 1031
<212> DNA
<213> Haematococcus pluvialis

<220>
<221> CDS
<222> (6)..(1031)
<223>

<400> 26
gaagc atg cag cta gca gcg aca gta atg ttg gag cag ctt acc gga agc 50
Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser
1 5 10 15
gct gag gca ctc aag gag aag gag aag gag gtt gca ggc agc tct gac 98
Ala Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp
20 25 30
gtg ttg cgt aca tgg gcg acc cag tac tcg ctt ccg tca gag gag tca 146

Val	Leu	Arg	Thr	Ala	Thr	Gln	Tyr	Ser	Leu	Pro	Ser	Glu	Ser		
			35				40				45				
gac	gcg	gcc	cgc	cgc	gga	ctg	aag	aat	gcc	tac	aag	cca	cca	cct	tcc
Asp	Ala	Ala	Arg	Pro	Gly	Leu	Lys	Asn	Ala	Tyr	Lys	Pro	Pro	Pro	Ser
		50					55					60			
gac	aca	aag	ggc	atc	aca	atg	gcg	cta	gct	gtc	atc	ggc	tcc	tgg	gct
Asp	Thr	Lys	Gly	Ile	Thr	Met	Ala	Leu	Ala	Val	Ile	Gly	Ser	Trp	Ala
	65					70				75					
gca	gtg	ttc	ctc	cac	gcc	att	ttt	caa	atc	aag	ctt	cgc	acc	tcc	ttg
Ala	Val	Phe	Leu	His	Ala	Ile	Phe	Gln	Ile	Lys	Leu	Pro	Thr	Ser	Leu
80					85					90					95
gac	cag	ctg	cac	tgg	ctg	ccc	gtg	tca	gat	gcc	aca	gct	cag	ctg	gtt
Asp	Gln	Leu	His	Trp	Leu	Pro	Val	Ser	Asp	Ala	Thr	Ala	Gln	Leu	Val
				100					105					110	
agc	ggc	agc	agc	agc	ctg	ctg	cac	atc	gtc	gta	gta	ttc	ttt	gtc	ctg
Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Leu	Leu	His	Ile	Val	Val	Val	Phe	Phe	Val	Leu
			115					120					125		
gag	ttc	ctg	tac	aca	ggc	ctt	ttt	atc	acc	acg	cat	gat	gct	atg	cat
Glu	Phe	Leu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Phe	Ile	Thr	Thr	His	Asp	Ala	Met	His
		130					135					140			
ggc	acc	atc	gcc	atg	aga	aac	agg	cag	ctt	aat	gac	ttc	ttg	ggc	aga
Gly	Thr	Ile	Ala	Met	Arg	Asn	Arg	Gln	Leu	Asn	Asp	Phe	Leu	Gly	Arg
	145					150					155				
gta	tgc	atc	tcc	ttg	tac	gcc	tgg	ttt	gat	tac	aac	atg	ctg	cac	cgc
Val	Cys	Ile	Ser	Leu	Tyr	Ala	Trp	Phe	Asp	Tyr	Asn	Met	Leu	His	Arg
160					165					170					175
aag	cat	tgg	gag	cac	cac	aac	cac	act	ggc	gag	gtg	ggc	aag	gac	cct
Lys	His	Trp	Glu	His	His	Asn	His	Thr	Gly	Glu	Val	Gly	Lys	Asp	Pro
				180					185					190	
gac	ttc	cac	agg	gga	aac	cct	ggc	att	gtg	ccc	tgg	ttt	gcc	agc	ttc
Asp	Phe	His	Arg	Gly	Asn	Pro	Gly	Ile	Val	Pro	Trp	Phe	Ala	Ser	Phe
			195					200					205		
atg	tcc	agc	tac	atg	tgc	atg	tgg	cag	ttt	gcg	cgc	ctc	gca	tgg	tgg
Met	Ser	Ser	Tyr	Met	Ser	Met	Trp	Gln	Phe	Ala	Arg	Leu	Ala	Trp	Trp
			210				215						220		
acg	gtg	gtc	atg	cag	ctg	ctg	ggt	gcg	cca	atg	gcg	aac	ctg	ctg	gtg
Thr	Val	Val	Met	Gln	Leu	Leu	Gly	Ala	Pro	Met	Ala	Asn	Leu	Leu	Val
	225					230					235				
ttc	atg	gcg	gcc	gcg	ccc	atc	ctg	tcc	gcc	ttc	cgc	ttg	ttc	tac	ttt
Phe	Met	Ala	Ala	Ala	Pro	Ile	Leu	Ser	Ala	Phe	Arg	Leu	Phe	Tyr	Phe
240					245					250					255
ggc	acg	tac	atg	ccc	cac	aag	cct	gag	cct	ggc	gcc	gcg	tca	ggc	tct
Gly	Thr	Tyr	Met	Pro	His	Lys	Pro	Glu	Pro	Gly	Ala	Ala	Ser	Gly	Ser

2

265

70

tca cca gcc gtc atg aac tgg tgg aag tgc cgc act agc cag gcg tcc 866
 Ser Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser
 275 280 285

gac ctg gtc agc ttt ctg acc tgc tac cac ttc gac ctg cac tgg gag 914
 Asp Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu
 290 295 300

cac cac cgc tgg ccc ttt gcc ccc tgg tgg gag ctg ccc aac tgc cgc 962
 His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg
 305 310 315

cgc ctg tct ggc cga ggt ctg gtt cct gcc gag caa aaa ctc atc tca 1010
 Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser
 320 325 330 335

gaa gag gat ctg aat agc tag 1031
 Glu Glu Asp Leu Asn Ser
 340

<210> 27
 <211> 341
 <212> PRT
 <213> Haematococcus pluvialis

<400> 27

Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala
 1 5 10 15

Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val
 20 25 30

Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp
 35 40 45

Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp
 50 55 60

Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala
 65 70 75 80

Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp
 85 90 95

Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser
 100 105 110

Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe P Val Leu Glu
 115 120 125

Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly
 130 135 140

Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val
 145 150 155 160

Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys
 165 170 175

His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp
 180 185 190

Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met
 195 200 205

Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr
 210 215 220

Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe
 225 230 235 240

Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly
 245 250 255

Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser
 260 265 270

Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp
 275 280 285

Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His
 290 295 300

His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg
 305 310 315 320

Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu
 325 330 335

Glu Asp Leu Asn S
340

<210> 28
<211> 777
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana

<220>
<221> promoter
<222> (1)..(777)
<223>

<400> 28
gagctcactc actgatttcc attgcttgaa aattgatgat gaactaagat caatccatgt 60
tagtttcaaa acaacagtaa ctgtggccaa cttagttttg aaacaacact aactggtcga 120
agcaaaaaga aaaaagagtt tcatcatata tctgatttga tggactgttt ggagtttagga 180
ccaaacatta tctacaaaca aagacttttc tctaacttg tgattccttc ttaaacccta 240
ggggtaatat tctattttcc aaggatcttt agttaaggc aaatccggga aattattgta 300
atcatttggg gaaacatata aaagatttga gttagatgga agtgacgatt aatccaaaca 360
tatatatctc tttcttctta tttcccaa atacagacaa aagtagaata ttggctttta 420
acaccaatat aaaaacttgc ttcacacctt aacacttttg tttacttttag ggtaagtgca 480
aaaagccaac caaatccacc tgcactgatt tgacgtttac aaacgccgtt aagtcgatgt 540
ccgttgattt aaacagtgtc ttgtaattaa aaaaatcagt ttacataaat ggaaaattta 600
tcacttagtt ttcatcaact tctgaaacta cttttcatgg attaggcaat actttccatt 660
tttagtaact caagtggacc ctttacttct tcaactccat ctctctcttt ctatttcact 720
tctttcttct cattatatct cttgtcctct ccaccaaatc tcttcaacaa aaagctt 777

<210> 29
<211> 22
<212> DNA
<213> kuenstlich

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(22)
<223>

<400> 29
gcaagctcga cagctacaaa cc

22

<210> 30
<211> 24
<212> DNA
<213> kuenstlich

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(24)
<223>

<400> 30
gaagcatgca gctagcagcg acag

24

<210> 31
<211> 30
<212> DNA
<213> kuenstlich

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(30)
<223>

<400> 31
tgcattgctag aggcactcaa ggagaaggag

30

<210> 32
<211> 59
<212> DNA
<213> kuenstlich

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(59)
<223>

<400> 32
ctagctattc agatcctctt ctgagatgag tttttgctcg gcaggaacca gacctcggc

59

<210> 33
<211> 28
<212> DNA
<213> kuenstlich

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(28)
<223>

<400> 33
gagctcactc actgatttcc attgcttg

28

<210> 34
<211> 37
<212> DNA
<213> kuenstlich

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(37)
<223>

<400> 34
cgccggttaag tcgatgtccg ttgatttaaa cagtgtc

37

<210> 35
<211> 34
<212> DNA
<213> kuenstlich

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(34)
<223>

<400> 35
atcaacggac atcgacttaa cggcgtttgt aaac

34

<210> 36
<211> 25
<212> DNA
<213> kuenstlich

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(25)
<223>

<400> 36
taagcttttt gttgaagaga tttgg

25

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von genetisch veränderten Pflanzen, die in Früchten eine Ketolase-Aktivität aufweisen.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man genetisch veränderte Pflanzen verwendet, die in Früchten eine Ketolase exprimieren.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass man genetisch veränderte Pflanzen verwendet, die in Früchten mindestens eine Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthalten.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass man genetisch veränderte Pflanzen verwendet, in die man ausgehend von einer Ausgangspflanze mindestens eine Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, eingebracht hat.

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren einbringt, die ein Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO. 2 und die enzymatische Eigenschaft einer Ketolase aufweist.

6. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO. 1 einbringt.

7. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren einbringt die ein Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 16 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO. 16 und die enzymatische Eigenschaft einer Ketolase aufweist.

8. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO. 15 einbringt.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass man genetisch veränderte Pflanzen verwendet, die in Früchten die höchste Expressionsrate einer Ketolase aufweisen.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Genexpression der Ketolase unter Kontrolle eines fruchtspezifischen Promotors erfolgt.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanze eine Pflanze verwendet, die in Früchten Chromoplasten aufweist.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanze eine Pflanze ausgewählt aus den Pflanzengattungen Actinophloeus, Aglaeonema, Ananas, Arbutus, Archontophoenix, Area, Aronia, Asparagus, Attalea, Berberis, Bixia, Brachychilum, Bryonia, Caliptocalix, Capsicum, Carica, Celastrus, Citrullus, Citrus, Convallaria, Cotoneaster, Crataegus, Cucumis, Cucurbita, Cuscuta, Cycas, Cyphomandra, Dioscorea, Diospyrus, Dura, Elaeagnus, Elaeis, Erythroxylon, Euonymus, Ficus, Fortunella, Fragaria, Gardinia, Gonocaryum, Gossypium, Guava, Guilielma, Hibiscus, Hippophaea, Iris, Lathyrus, Lonice-
ra, Luffa, Lycium, Lycopersicum, Malpighia, Mangifera, Moringa, Murraya, Musa, Nenga, Palisota, Pandanus, Passiflora, Persea, Physalis, Prunus, Ptychandra, Punica, Pyracantha, Pyrus, Ribes, Rosa, Rubus, Sambal, Sambucus, Scaevola, Shepherdia, Solanum, Sorbus, Synspermatophyta, Tabernaemontana, Tamus, Taxus, Trichosanthes, Triphasia, Vaccinium, Viburnum, Vigna oder Vitis verwendet.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass man nach dem Kultivieren die genetisch veränderten Pflanzen erntet und anschließend die Ketocarotinoide aus den Früchten der Pflanzen isoliert.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Ketocarotinoide ausgewählt sind aus der Gruppe Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinenon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin und Adonixanthin.

15. Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend funktionell verknüpft einen fruchtspezifischen Promotor und eine Nukleinsäure kodierend eine Ketolase.

16. Genetisch veränderte Pflanze, die in Früchten eine Ketolase-Aktivität aufweist.

17. Genetisch veränderte Pflanze nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderte Pflanze in den Früchten eine Ketolase exprimiert.

18. Genetisch veränderte Pflanze nach Anspruch 16 oder 17, enthaltend in Früchten mindestens eine Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase.

19. Genetisch veränderte Pflanze nach einem der Ansprüche 16 bis 18, dadurch gekennzeichnet dass

man in die Pflanze aus und von einer Ausgangspflanze mindestens eine Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, eingebracht hat.

20. Genetisch veränderte Pflanze, ausgewählt aus den Pflanzengattungen Actinophloeus, Aglaeonema, Ananas, Arbutus, Archontophoenix, Area, Aronia, Asparagus, Attalea, Berberis, Bixia, Brachychilum, Bryonia, Caliptocalix, Capsicum, Carica, Celastrus, Citrullus, Citrus, Convallaria, Cotoneaster, Crataegus, Cucumis, Cucurbita, Cuscuta, Cycas, Cyphomandra, Dioscorea, Diospyrus, Dura, Elaeagnus, Elaeis, Erythroxylon, Euonymus, Ficus, Fortunella, Fragaria, Gardinia, Gonocaryum, Gossypium, Guava, Guilielma, Hibiscus, Hippophaea, Iris, Lathyrus, Lonicera, Luffa, Lycium, Lycopersicum, Malpighia, Mangifera, Mormodica, Murraya, Musa, Nenga, Palisota, Pandanus, Passiflora, Persea, Physalis, Prunus, Ptychandra, Punica, Pyracantha, Pyrus, Ribes, Rosa, Rubus, Sabal, Sambucus, Seaforita, Shepherdia, Solanum, Sorbus, Synaspodix, Tabernae, Taxus, Trichosanthes, Triphasia, Vaccinium, Viburnum, Vignia oder Vitis, enthaltend mindestens eine Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase.

21. Genetisch veränderte Pflanze nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Ketolase in Früchten exprimiert wird.

22. Genetisch veränderte Pflanze nach einem der Ansprüche 16 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Expressionsrate einer Ketolase in Früchten am höchsten ist.

23. Verwendung der genetisch veränderten Pflanzen nach einem der Ansprüche 16 bis 22 als Futter- oder Nahrungsmittel.

24. Verwendung der Früchte der genetisch veränderten Pflanzen nach einem der Ansprüche 17 bis 23 zur Herstellung von Ketocarotinoid-haltigen Extrakten oder zur Herstellung von Futter- oder Nahrungsergänzungsmitteln.

25. Verfahren zur Herstellung von genetisch veränderten Pflanzen gemäß Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend funktionell verknüpft einen fruchtspezifischen Promotor und Nukleinsäuren kodierend eine Ketolase in das Genom der Ausgangspflanze einführt.

Es folgen 9 Blatt Zeichnungen

Abbildung 1: Biosyntheschema von Carotinoiden in Tomatenfrüchten

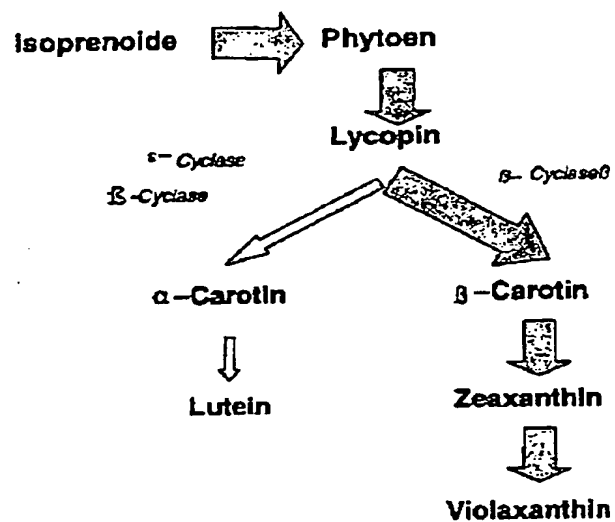


Abbildung 2: Biosyntheschema von Astaxanthin in genetisch veränderten Tomatenfruechten

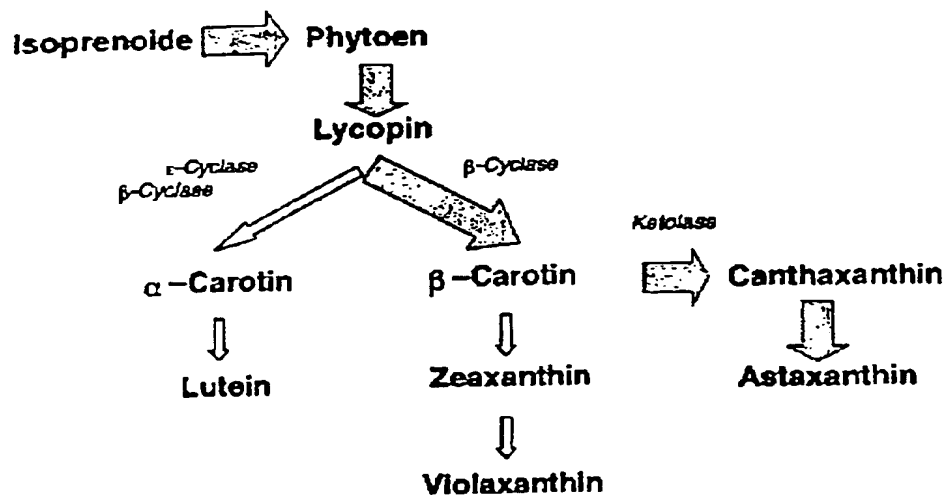


Abbildung 3: Nukleotidsequenzvergleich

```

KETO2.seq  ATCCAGCTAGCAGCGACAGTAATGTTGGAGCAGCTTACCGGAAGGCTGAGCCACTCAAGGAGAGCGAGAGCGGTTCCAGCCAGCTCTGAGCTGTTCC 100
X86782.seq  ATCCAGCTAGCAGCGACAGTAATGTTGGAGCAGCTTACCGGAAGGCTGAGCCACTCAAGGAGAGCGAGAGCGGTTCCAGCCAGCTCTGAGCTGTTCC 100

KETO2.seq  GTACATGCGCGAGCCAGTACTGCTTTCGGTCAGAGGAGTCAGAGCGCGCGCGCGCGCGGACTGAAGATGCTTACAAGCCAGCCAGCTTCCGACACAAAGGG 200
X86782.seq  GTACATGCGCGAGCCAGTACTGCTTTCGGTCAGAGGAGTCAGAGCGCGCGCGCGCGGACTGAAGATGCTTACAAGCCAGCCAGCTTCCGACACAAAGGG 200

KETO2.seq  CATTCACAATGCGGCTAGCTGTGCATGCGCTGCTGCGCGCGAGTGTTCCTCCAGGCCATTTTCAATCAAGCTTCCGAGCTGCTTCCAGCCAGCTGCACTGG 300
X86782.seq  CATTCACAATGCGGCTAGCTGTGCATGCGCTGCTGCGCGCGAGTGTTCCTCCAGGCCATTTTCAATCAAGCTTCCGAGCTGCTTCCAGCCAGCTGCACTGG 300

KETO2.seq  CTGCGCGGTGTCAGATGCCACAGCTCAGCTGCTTACCGCGAGCCAGCCAGCTGCTGACATGCTGGTAGTATTCCTTTGTCCTGGAGTTCCTGTACACAGGCG 400
X86782.seq  CTGCGCGGTGTCAGATGCCACAGCTCAGCTGCTTACCGCGAGCCAGCCAGCTGCTGACATGCTGGTAGTATTCCTTTGTCCTGGAGTTCCTGTACACAGGCG 400

KETO2.seq  TTTTATCACCAGCCATGATGCTATGCAATGCCAGCATGCCATGAGAAACAGCCAGCTTAATGACTTCTTGGCGAGAGTATGCACTCTCTTGTAGCGCTG 500
X86782.seq  TTTTATCACCAGCCATGATGCTATGCAATGCCAGCATGCCATGAGAAACAGCCAGCTTAATGACTTCTTGGCGAGAGTATGCACTCTCTTGTAGCGCTG 500

KETO2.seq  GTTTGATTACACATGCTGCCAGCCAGCCATGCGAGCCAGCCAGCCAGCTGCGAGGTGCGCAAGGAGCCCTGACTTCCACAGCGGAAAGCCCTGCGATT 600
X86782.seq  GTTTGATTACACATGCTGCCAGCCAGCCATGCGAGCCAGCCAGCCAGCTGCGAGGTGCGCAAGGAGCCCTGACTTCCACAGCGGAAAGCCCTGCGATT 600

KETO2.seq  GTGCGCTGGTTTGGCAGCTTTCATGTCCAGCTACATGTGGATGTGGCAGTTTGGCGCGCTGGCATGGTGGAGCGGTGGTATCCAGCTGCTGGGTGGCGCAA 700
X86782.seq  GTGCGCTGGTTTGGCAGCTTTCATGTCCAGCTACATGTGGATGTGGCAGTTTGGCGCGCTGGCATGGTGGAGCGGTGGTATCCAGCTGCTGGGTGGCGCAA 700

KETO2.seq  TGGCGAAGCTGCTGGTGTTCATGCGCGCGCGCGCGCGCATGCTGTGCGCGCTTCCGCTTGTCTACTTTGGCAGGTACATGCGCGCACAAAGCTGAGCGCTGGCG 800
X86782.seq  TGGCGAAGCTGCTGGTGTTCATGCGCGCGCGCGCGCGCATGCTGTGCGCGCTTCCGCTTGTCTACTTTGGCAGGTACATGCGCGCACAAAGCTGAGCGCTGGCG 800

KETO2.seq  CCGGTCAAGCTCTTCAGCAGCGGTGATGAAGTGGTGGAGTGGCGACTAGCCAGCGGTGGAGCTGGTCAAGCTTCTGAGCTGCTAAGCACTTCCAGCTG 900
X86782.seq  CCGGTCAAGCTCTTCAGCAGCGGTGATGAAGTGGTGGAGTGGCGACTAGCCAGCGGTGGAGCTGGTCAAGCTTCTGAGCTGCTAAGCACTTCCAGCTG 900

KETO2.seq  CACTGGAGCAGCCAGCCCTGCGGCTTTGCGCGCTGGTGGAGCTGGCGAAGTGGCGCGCGCTGTCTGGCGAGGTCCTGGTTCTGCTAG 990
X86782.seq  CACTGGAGCAGCCAGCCCTGCGGCTTTGCGCGCTGGTGGAGCTGGCGAAGTGGCGCGCGCTGTCTGGCGAGGTCCTGGTTCTGCTAG 990

```

Abbildung 4: Proteinsequenzvergleich

```

KET02.pro  MQLAATVMLEQLTGS AEALKEKEKEVAGSSDVLRTWATQYSLPSEESDAA 50
X86782.pro MQLAATVMLEQLTGS AEALKEKEKEVAGSSDVLRTWATQYSLPSEESDAA 50

KET02.pro  R P Q L K N A Y K P P P S D T K G I T M A L A V I G S W A A V F L H A I F Q I K L P T S L D Q L H W 100
X86782.pro R P G L K N A Y K P P P S D T K G I T M A L R V I G S W A A V F L H A I F Q I K L P T S L D Q L H W 100

KET02.pro  L P V S D A T A Q L V S G S S S L L H I V V V F F V L E F L Y T G L F I T T H D A M H G T I A M R N 150
X86782.pro L P V S D A T A Q L V S G T S S L L D I V V V F F V L E F L Y T G L F I T T H D A M H G T I A M R N 150

KET02.pro  R Q L N D F L G R V C I S L Y A W F D Y N M L H R K H W E H H N H T G E V G K D P D F H R G N P G I 200
X86782.pro R Q L N D F L G R V C I S L Y A W F D Y N M L H R K H W E H H N H T G E V G K D P D F H R G N P G I 200

KET02.pro  V P W F A S F M S S Y M S M W Q F A R L A W W T V V M Q L L G A P M A N L L V F M A A A P I L S A F 250
X86782.pro V P W F A S F M S S Y M S M W Q F A R L A W W T V V M Q L L G A P M A N L L V F M A A A P I L S A F 250

KET02.pro  R L F Y F G T Y M P H K P E P G A A S G S S P A V M N W W K S R T S Q A S D L V S F L T C Y H F D L 300
X86782.pro R L P Y F G T Y M P H K P E P G A A S G S S P A V M N W W K S R T S Q A S D L V S F L T C Y H F D L 300

KET02.pro  H W E H H R W P F A P W W E L P N C R R L S G R G L V P A 329
X86782.pro H W E H H R W P F A P W W E L P N C R R L S G R G L V P A 329

```

Abbildung 5: Konstrukt zur Überexpression des β -C-4-Oxygenase Proteins aus *H. pluvialis* mit rbcS Transitpeptid aus Erbse unter Kontrolle des d35S-Promoters (Tomatentransformationskonstrukt)

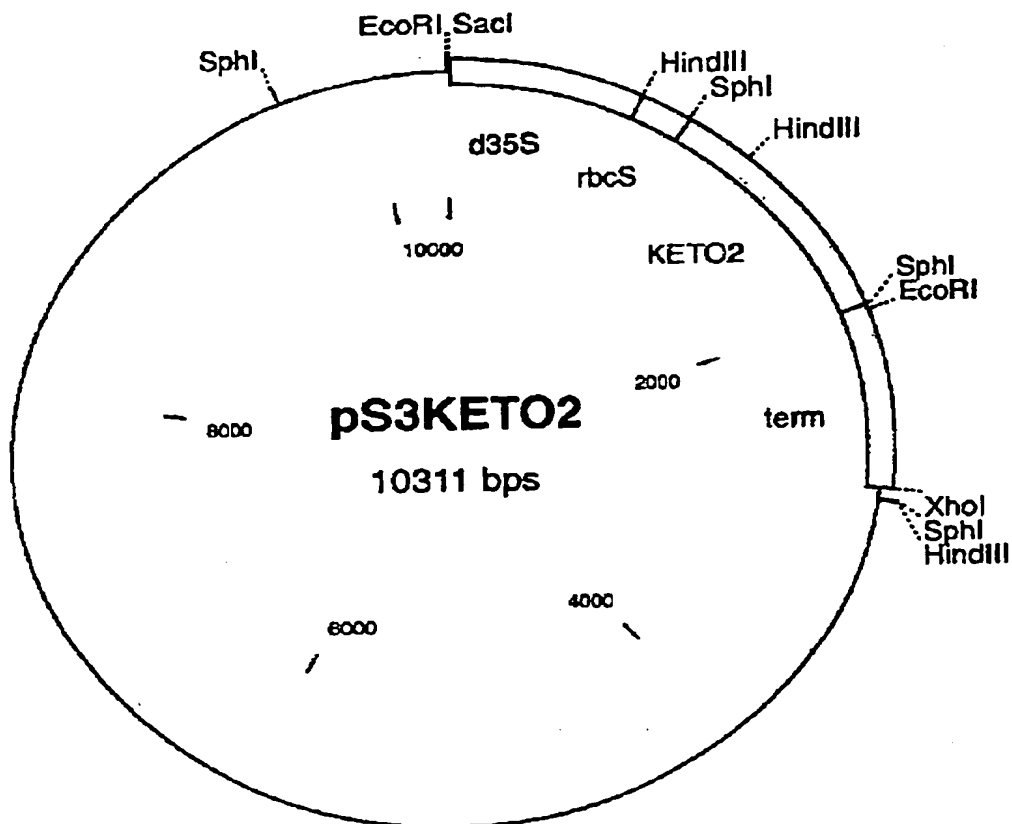


Abbildung 6: Konstrukt zur Überexpression des N-terminal verkürzten Ketolase (β -C-4-Oxygenase) Proteins aus *H. pluvialis* mit rbcS Transitpeptid aus Erbse unter Kontrolle des d35S-Promoters.

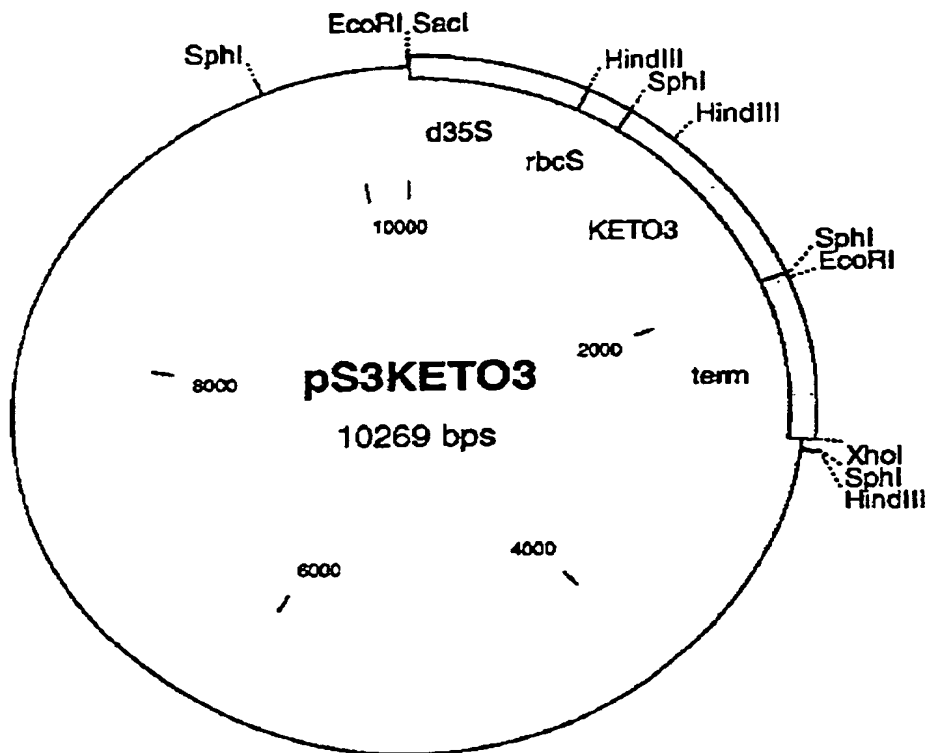


Abbildung 7: Konstrukt zur Überexpression des Ketolase (β -C-4-Oxygenase) Proteins aus *H. pluvialis* mit rbcS Transitpeptid aus Erbse und C-terminalem myc-Tag unter Kontrolle des d35S-Promoters.

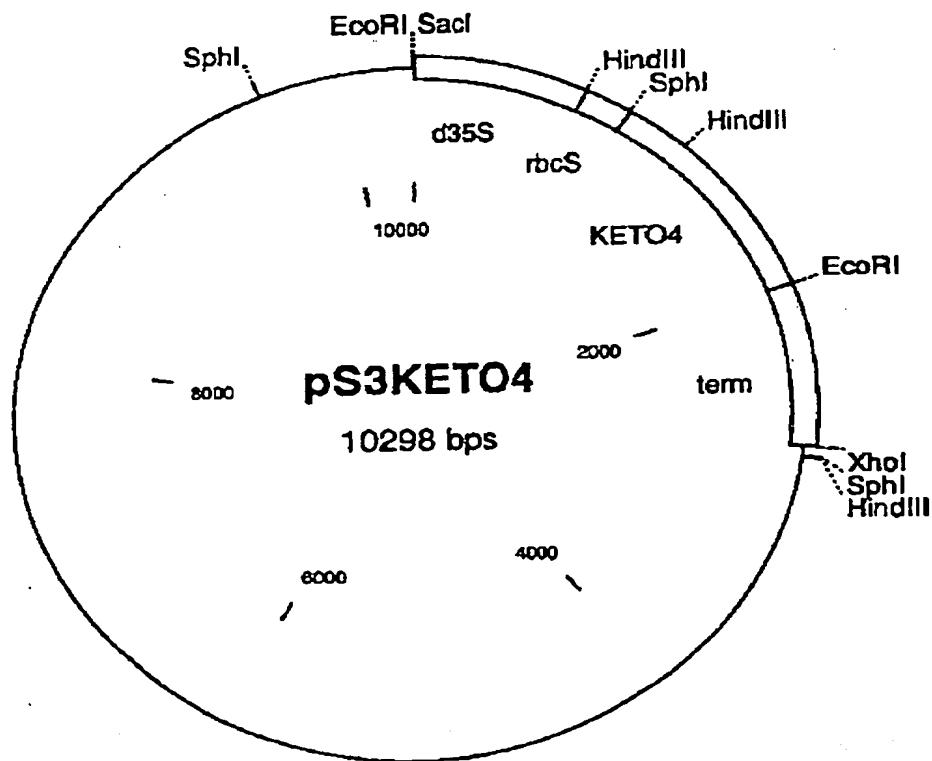


Abbildung 8: Konstrukt zur Überexpression der β -C-4-Oxygenase Protein aus *H. pluvialis* mit rbcS Transitpeptide aus Erbse unter Kontrolle des AP3P-Promoters (Tomatentransformationskonstrukt).

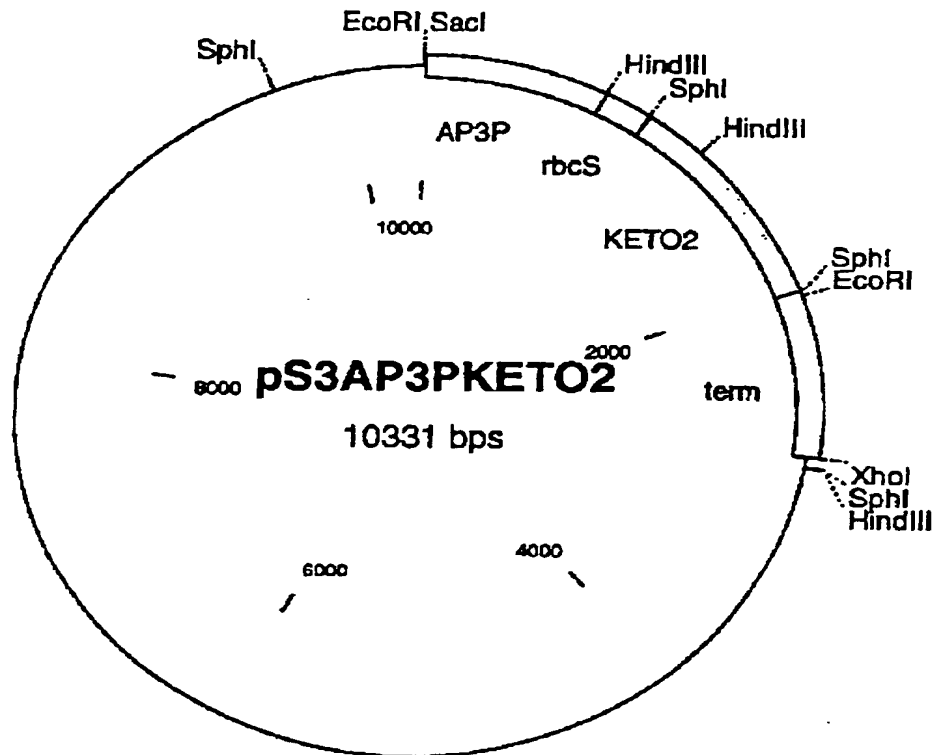
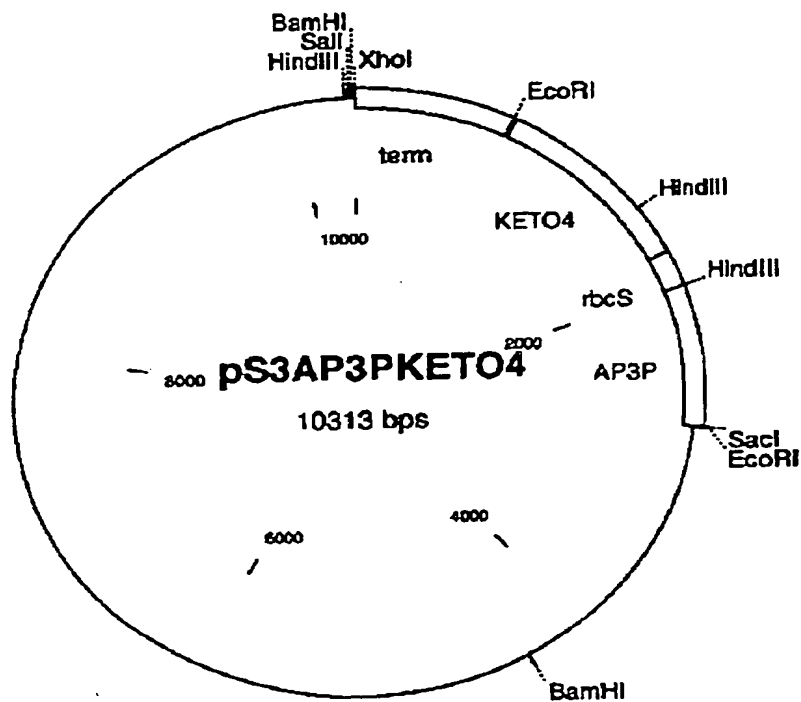


Abbildung 9: Konstrukt zur Überexpression des Ketolase (β -C-4-Oxy-
genase) Proteins aus *H. pluvialis* mit rbcS Transitpeptid aus
Erbse und C-terminalem myc-Tag unter Kontrolle des AP3P-Promo-
ters.



THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☒ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☒ OTHER: holds between words

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)